



**COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE LAS HOJAS DE *CONYZA
BONARIENSIS*, *GNAPHALIUM PELLITUM* Y *ACHYROCLINE
SATUREIOIDES*, POR CG-EM Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA Y ANTIOXIDANTE.**

WILLIAM ALEJANDRO ANDRADE BARREIRO

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
BOGOTA
2015**

**COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE LAS HOJAS DE *CONYZA BONARIENSIS*, *GNAPHALIUM PELLITUM* Y *ACHYROCLINE SATUREIODES*,
POR CG-EM Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y
ANTIOXIDANTE.**

WILLIAM ALEJANDRO ANDRADE BARREIRO

**Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Magister en ciencias biológicas.**

Director:

Oscar Eduardo Rodríguez Aguirre.

Lic –M.Sc. – Ph.D

Facultad de Ingeniería. Universidad El Bosque
Profesor Catedrático Pontificia Universidad Javeriana
Bogotá, Colombia

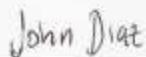
**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
BOGOTÁ
2015**

COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE LAS HOJAS DE *CONYZA BONARIENSIS*, *GNAPHALIUM PELLITUM* Y *ACHYROCLINE SATUREIODES*, POR CG-EM Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIOXIDANTE.

WILLIAM ALEJANDRO ANDRADE BARREIRO

ACEPTACIÓN

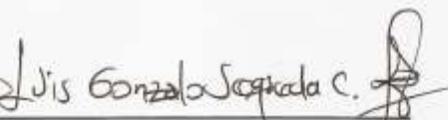
JURADOS



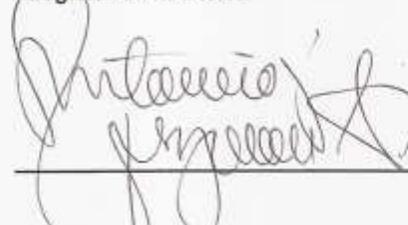
John Edwar Diaz
Magister en Ciencias



Oscar Eduardo Rodríguez Aguirre
Ph Doctor. Master en ciencias.
Director Tesis



Luis Gonzalo Sequeda.
Magister en Ciencias



Antonio Guzmán.
Magister en Ciencias

**COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE LAS HOJAS DE *CONYZA BONARIENSIS*, *GNAPHALIUM PELLITUM* Y *ACHYROCLINE SATUREIOIDES*,
POR CG-EM Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y
ANTIOXIDANTE.**

WILLIAM ALEJANDRO ANDRADE BARREIRO

Dra.: Concepción Judith Puerta B
Decana Facultad de Ciencias

Dra.: Alba A. Trespalacios R
Directora Posgrado
Facultad de Ciencias

DEDICATORIA.

A mi bebe, María Alejandra, motor de mi vida.

AGRADECIMIENTOS.

A toda persona que de una u otra forma aportaron para que este trabajo se llevara a cabo. En especial al Doctor Oscar Eduardo Rodríguez Aguirre, que sin su dirección y apoyo no se hubiera podido lograr.

“Los criterios expuestos, las opiniones expresadas y conclusiones anotadas son responsabilidad sólo del autor y no comprometen en nada a la Pontificia Universidad Javeriana”

Artículo 9.18 del reglamento de los trabajos de grado y de investigación
Agosto de 1989.

TABLA DE CONTENIDOS.

Pag

RESUMEN	1
JUSTIFICACION.....	3
OBJETIVOS.....	5
OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	5
INTRODUCCIÓN	6
1 ESTADO DEL ARTE	8
1.1 Aceites esenciales.	8
1.1.1 Clasificación.....	8
1.1.2 Distribución y estado natural.....	9
1.2 Aspectos botánicos de la familia Asteraceae.	9
1.2.1 Ecología.	9
1.2.2 Taxones incluidos en las Asteráceas.	10
1.2.3 Descripción de las plantas del Estudio.....	10
1.2.4 Empleo tradicional de las especies botánicas en estudio.	13
1.3 Descripción taxonómica de las plantas del estudio.....	13
1.3.1 Composición química reportada en otros estudios.....	14
1.4 Actividad biológica reportada en estudios previos de este género.....	15
2 METODOLOGÍA	20
2.1 Recolección y preparación del material vegetal.....	20
2.2 Métodos de extracción.	21
2.2.1 Arrastre por vapor (AV).....	22
2.2.2 Hidrodestilación (HD) en equipo Clevenger.	23
2.2.3 Tratamiento de los aceites esenciales.	24
2.3 Determinación del porcentaje (%) de rendimiento y densidad absoluta.....	25

2.3.1	Porcentaje de rendimiento.....	25
2.3.2	Densidad absoluta.	25
2.4	Identificación de los compuestos de los aceites esenciales.	25
2.4.1	Identificación de sustancias presentes en los aceites esenciales obtenidos de hojas de <i>C bonariensis</i> , <i>G pellitum</i> y <i>A satureioides</i>	26
2.5	Determinación de actividades biológicas.....	27
2.5.1	Actividad antioxidante.	27
2.5.2	Antioxidantes.	30
2.5.3	Solventes y reactivos	32
2.5.4	Métodos de actividad antioxidante que combina transferencia de un solo electrón y transferencia de un átomo de hidrogeno (ET-HAT).	33
2.5.5	Actividad de barrido de radicales libres – DPPH [*]	33
2.6	Actividad antibacteriana.	36
2.6.1	Preparación de las cepas bacterianas:	38
3	RESULTADOS.....	42
3.1	Obtención de los aceites.....	42
3.2	Análisis por Cromatografía de gases acoplado a masas.....	42
3.3	Actividad antioxidante por DPPH [*]	50
3.4	Actividad antibacteriana.	52
4	ANALISIS DE RESULTADOS.	56
4.1	Identificación taxonómica de las plantas.	56
4.2	Porcentaje de rendimiento.	56
4.3	Identificación de los compuestos presentes en los aceites esenciales.	57
4.3.1	Identificación de los aceites esenciales obtenidos de las hojas.	57
4.4	Actividad antioxidante.....	59
4.4.1	Análisis estadístico de la actividad antioxidante.	66
4.5	Actividad antibacteriana.	73
5	CONCLUSIONES.....	75
6	PERPECTIVAS Y APLICACIONES.....	77
7	BIBLIOGRAFIA.	78

ANEXOS I	ESPECTROS ACEITES ESENCIALES	85
ANEXO II	TABLAS ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DDPH°	101
ANEXO III	LINEALIZACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	108
ANEXO IV	CERTIFICADO IDENTIFICACIÓN PLANTAS	112

INDICE DE TABLAS

Pag

Tabla 1	Clasificación científica de <i>Coniza bonariensis</i> .	13
Tabla 2	Clasificación científica de <i>Achyrocline satureioides</i>	14
Tabla 3	Clasificación científica de <i>Gnaphalium pellitum Kunth</i> .	14
Tabla 4	Mecanismos de acción de algunos antioxidantes	31
Tabla 5	Solventes y reactivos	32
Tabla 6	Relación peso material- peso aceite esencial	42
Tabla 7	Datos <i>C bonariensis HD</i> .	43
Tabla 8	Datos <i>C bonariensis AV</i> .	44
Tabla 9	Datos de <i>G pellitum. HD</i> .	46
Tabla 10	Datos de <i>G pellitum. AV</i> .	47
Tabla 11	Datos <i>A satureioides. HD</i> .	48
Tabla 12	Datos <i>A satureioides. AV</i> .	49
Tabla 13	Actividad antioxidante del ácido Ascórbico.	50
Tabla 14	Actividad antioxidante del aceite de <i>C bonariensis (HD)</i>	51
Tabla 15	Actividad antioxidante del aceite de <i>C bonariensis (AV)</i> .	51
Tabla 16	Actividad antioxidante del aceite de <i>G pellitum (HD)</i>	51
Tabla 17	Actividad antioxidante del aceite de <i>G pellitum (AV)</i> .	51
Tabla 18	Actividad antioxidante del aceite de <i>A satureioides (HD)</i>	52
Tabla 19	Actividad antioxidante del aceite de <i>A satureioides (AV)</i>	52
Tabla 20	Aceites y bacterias <i>Staphylococcus aureus</i>	53
Tabla 21	Aceites y bacterias <i>Pseudomona aeruginosa</i>	53
Tabla 22	Aceites y Bacterias <i>Proteus mirabilis</i>	54
Tabla 23	Aceites y Bacterias <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	54
Tabla 24	Aceites y Bacterias <i>Escherichia coli</i>	55
Tabla 25	Rendimiento del proceso de extracción.	56
Tabla 26	Resultados Antioxidante IC_{50}	65
Tabla 27	Variable dependiente: $RtaLog IC_{50}$	67
Tabla 28	Resultados variable dependiente: $Rta Log IC_{50}$	67
Tabla 29	Respuesta $Log IC_{50}$	68
Tabla 30	Variable dependiente: <i>RTA</i>	70
Tabla 31	Pruebas de los efectos inter-sujetos	70
Tabla 32	Respuesta datos análisis planta tendencia.	71
Tabla 33	C_{50} de los aceites de las hojas	73
Tabla 34	ABR de los aceites de las hojas	73
Tabla 35	mg de los aceites que presentan actividad	74

INDICE DE FIGURAS

		pag.
Figura 1	<i>Conyza bonariensis</i> .	11
Figura 2	<i>Achyrocline satureioides</i>	12
Figura 3	<i>Gnaphalium pellitum</i>	12
Figura 4	Mapa ubicación plantas	20
Figura 5	Métodos de extracción de mezclas aromáticas.	21
Figura 6	Equipo de destilación por arrastre de vapor AV	23
Figura 7	Proceso de obtención del aceite esencial por HD	24
Figura 8	Radical DPPH°	28
Figura 9	Reactivo DPPH°	32
Figura 10	Estructura del radical DPPH°.	33
Figura 11	Diagrama del método DPPH°	35
Figura 12	Proceso preparación medios	37
Figura 13	Preparación medios de cultivo	38
Figura 14	Distribución de pozos en cajas de petri	40
Figura 15	Protocolo de siembra de extractos.	40
Figura 16	Esquema de los halos de inhibición formado por el método de difusión en gel.	41
Figura 17	Grafica Log concentración Vs Longitud de la corona (X^2)	41
Figura 18	Cromatograma de <i>Conyza bonariensis</i> . (HD).	42
Figura 19	Cromatograma de <i>Conyza bonariensis</i> (AV)	44
Figura 20	Cromatograma de <i>Gnaphalium pellitum</i>	45
Figura 21	Cromatograma de <i>Gnaphalium pellitum</i> .(AV)	46
Figura 22	Cromatograma de <i>Achyrocline satureioides</i> (HD).	48
Figura 23	Cromatograma de <i>Achyrocline satureioides</i> (AV).	49
Figura 24	Halos de C bonariensis y <i>Staphylococcus aureus</i>	52
Figura 25	Resultado % de aceite según planta	59
Figura 26	Relación aceites y patrón de referencia a 2,5 ppm	60
Figura 27	Relación aceites y patrón de referencia a 25 ppm	60
Figura 28	Comparación de aceites	61
Figura 29	IC ₅₀ Patrón (ácido ascórbico).	61
Figura 30	IC ₅₀ de C Bonariensis (HD) por DPPH°	62
Figura 31	IC ₅₀ de C bonariensis (AV) por DPPH°.	62
Figura 32	IC ₅₀ de G pelitum (HD) por DPPH°.	63
Figura 33	IC ₅₀ de G pellitum (AV) por DPPH°.	63
Figura 34	IC ₅₀ de A satureioides (HD) por DPPH°	64
Figura 35	IC ₅₀ por A satureioides (AV) por DPPH°	64
Figura 36	Aceites vs % captación	66
Figura 37	Aceites Vs $(1 / (IC_{50} \text{ muestra})) / (1 / (IC_{50} \text{ patrón})) \times 100$	66

Figura 38	Pruebas de los efectos inter- sujetos	67
Figura 39	Medidas marginales plantas	69
Figura 40	Medidas marginales método	69
Figura 41	Estadístico planta- método	70
Figura 42	Medidas marginales plantas 2	72
Figura 43	Medidas marginales método 2	72

RESUMEN

Las especies herbáceas *Gnaphalium pellitum*, *Achyrocline satureioides* y *Conyza bonariensis*, abundantes en América, que crece en los montes circunvecinos de la sabana de Bogotá y propia de la vegetación de subpáramo, se les ha referenciado con el nombre común de vira vira, que agrupan diversas especies de los géneros *Gnaphalium* y *Achyrocline*, todas presentes en el altiplano cundiboyacense, primeras plantas nativas de la sabana de Bogotá con propiedades medicinales descritas por los cronistas. Zamora (1635) la describe como "yerba calidísima, se halla en los páramos más helados y la virtud que tiene para expeler en sudores los achaques fríos, es muy experimentada". Según Hernández (1992), el sabio Mutis la prescribía y en la exposición de Lima, en 1878, fue referida como gran planta medicinal peruana; de igual modo, Farga y Lastra (1988) afirman que el término vira-vira procede del quechua (huira huira) y era planta empleada por los indígenas mapuche, aymara y quechua.

Durante el siglo pasado gozó de gran popularidad como depurativo de la sangre y en medicina popular se emplea como pectoral. Portilla (1951) reporta su uso como expectorante, sudorífico, febrífugo y vulneraria. García Barriga (1992) anota diferentes especies de *Gnaphalium* y *Achyrocline* con el nombre de vira-vira, eficaces para problemas de prostatitis, cáncer, inflamaciones y problemas dermatológicos.

En la Universidad Javeriana se han realizado diferentes investigaciones lideradas por el Dr. Rubén Darío Torrenegra, por sus resultados se les ha considerado a estas especies como promisorias, lo cual incentiva a realizar estudios más profundos y poder comparar sus actividades.

A los aceites esenciales de las tres especies colectadas en la región Cundiboyacense obtenidos por los métodos de hidrodestilación (HD) (equipo Clevenger) y arrastre por vapor (AV), se realizó el estudio por CG-EM y se verificó su actividad antioxidante por el método DPPH^{*}, así mismo se evaluó su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, y *Escherichia coli*.

Los aceites analizados por la técnica de CG-EM presentaron variedad de metabolitos por comparación con las bases de datos NIST-08 y WILLEY-08 y el índice de Kovats teórico y experimental. Los metabolitos más abundantes son para: *C. bonariensis* HD [Hexadecanoato de etilo (1,16 %), Tetradecanoato de 2-propilo

(1,76%), Hexadecanoato de metilo, (1,4%), 6,10,14- trimetil -2- pentadecanona, (0,30 %), Hexacosano, (1,2%)] *C. bonariensis* AV, [Globulol (0,89%), (Z)-7-Hexadecenal, (1,00%), epiglobulol, (0,95%), viridiflorol, (1,00%) alcohol cariofilénico (0,26%)]. *G. pellitum* HD [(Alfa-bisabolol 1.96%, 3-ciclopentil-1-(2,4-dimetilfenil)- 1-propanona. (No hay Teórico), –(–) Globulol, (1,84%), Oxido cariofilénico, (1,67), (+) – Ledol, (2,15)]. *G. pellitum* AV [(3e,6e,10e)-3,7,11,15-tetrametil-1,3,6,10,14-hexadecapenteno, (1,22%), Cariofileno, (0,92%), 1,2,3,5,6,8a - hexahidro - 4,7 - dimetil- 1- (1 - metiletil)- (1S - cis) naftaleno, (1,90), 1,1,4,7-tetrametildecahidro-1h-ciclopropana (E)azulen-4-ol. (0,94%)]. *A. saturoioides* HD [(3,3,6,6-Tetrametoxi-1,4-ciclohexadieno, 4,4a,5,6,7,8-hexahidro- 2(3H)-Naftalenona.(1,85%), Hexacosano, (1,58%), Butilhidroxitolueno, (0,72%), Acido (Z)-9-Octadecenoico, (0,19%).] *A. saturoioides* AV [(Triacontano (1,37%), 6,10,14-trimetil- 2-pentadecanona (1,35%), Hexatriacontano, (1.03 %) 2- metil- tricosano (3,13%), Pentadecanal. (2,04%)].

La evaluación de actividad antioxidante de los aceites a través del método que utiliza el radical libre 1,1-difenil-2- picrilhidrazilo (DPPH[•]) demostró una actividad similar para las diferentes especies y los métodos utilizados. A 250 ppm presentaron porcentajes de captación de por las técnicas de hidrodestilación y arrastre por vapor las especies vegetales *G. pellitum* (HD; AV) 48,22% y 34,84%. *A. saturoioides* (HD; AV) 41,14% y 44,44%. *C. bonariensis* (HD; AV) 47,90% y 46,13%. Mientras que el ácido ascórbico a 25 ppm 92,31%.

Los aceites de las especies *G. pellitum*, *A. saturoioides* y *C. bonariensis* obtenidos presentaron actividad antibacteriana frente a los microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, y *Escherichia coli*. mediante el método de difusión en gel por perforación en placas. Los aceites de *G. pellitum*, *A. saturoioides* y *C. bonariensis*, por las técnicas de hidrodestilación (HD) y arrastre por vapor (AV), presentaron Actividad Antibacteriana Relativa (ABR) frente a *Staphylococcus áureus* y respecto a la Rifaximina de 21.45% , 14.97%, 11.31%, 20.10%, 6.33%, y 8,35% respectivamente. *A. saturoioides* (AV) y *C. bonariensis* por las dos técnicas presentan ABR frente a *Staphylococcus epidermidis* de 24.50%, 8.54% y 11.24%. , A excepción de los aceites de *G. pellitum* (HD), (AV) y *A. saturoioides* (HD) los otros aceites presentaron actividad frente a *Escherichia coli*, destacándose el aceite de *A. saturoioides* (AV) con un ABR de 22,12% y *C. bonariensis* (AV) con un ABR de 10,15%. *C. bonariensis* (AV) frente a *Pseudomona aeruginosa* de 19,61% . *A. saturoioides* (HD y AV) frente a *Proteus mirabilis* 70.57% y 24.34%.

JUSTIFICACION

En el siglo XVIII fue posible conocer algunas propiedades medicinales de las plantas, así como su efecto sobre el organismo y la manera correcta de usarlas, pero ignorando completamente su composición. Con la invención del microscopio, el nacimiento de la fitoquímica y la genética, se hizo posible el reconocimiento y aislamiento de los principios activos de muchas especies vegetales. La mayoría de estos se han podido obtener sintéticamente en laboratorios para ser utilizado como fármaco (González P, 2003). El uso de las plantas medicinales nació desde el comienzo de la historia del hombre, desde la antigüedad hasta inicios del siglo XIX en diferentes civilizaciones se usaron las plantas para curar diversas enfermedades, esto por ensayo y error, hasta convertirse en una tradición. Esta práctica ancestral fue transmitida y perfeccionada a través de generaciones y actualmente se conoce como medicina tradicional o folclórica (Lizcano, 2008).

Colombia se caracteriza por tener una flora silvestre y ser catalogado como uno de los países más diversos, de las 260.000 especies registradas en el mundo, el 19,23 % de estas se encuentran en Colombia, de estas aproximadamente la tercera parte son endémicas (Calderón et al, 2007). Se calcula que los páramos Colombianos albergan alrededor de 118 familias, 566 géneros y 3379 especies, equivalentes a cerca del 12% de la flora calculada para todo el país. Estos ecosistemas están ubicados entre los 3000 y 3500 metros sobre el nivel del mar y se caracterizan por recibir luz solar todo el año con una calidad única por su ubicación geográfica en la zona ecuatorial, además son lugares especialmente estratégicos por su potencial hídrico y debido a su baja temperatura promedio lo cual permite el desarrollo de especies vegetales exclusivas de la zona (Rangel, J. 2001). Las plantas de este género son usadas como antiinflamatorio, antianémico, también antidiabéticos y se usa comúnmente para tratamientos de enfermedades gastrointestinales. (Heiden, et al, 2007; Katinas et al, 2007). Colombia se encuentra dentro del grupo de países en el mundo con mayor diversidad de plantas, contando con aproximadamente 50.000 especies, de las cuales en el territorio nacional se distribuyen y comercializan alrededor de 156 plantas aromáticas que constituyen cerca del 0.32% de las posibilidades totales de análisis y explotación (Rincón. 2012). Muchas de estas especies no han sido estudiadas en cuanto a composición y propiedades biológicas (Bandoni, 2000). Por tanto es de interés para el grupo de investigación de Fitoquímica de la Universidad Javeriana, GIFUJ, implementar metodologías que estén enfocadas en la extracción y caracterización de estos aceites esenciales, además de la identificación de sus propiedades biológicas,

adhiriéndose a los esfuerzos realizados por otros grupos de investigación, en pro del desarrollo del conocimiento científico con un fin; el de mejorar la agroindustria del país y darle un uso apropiado a la biodiversidad que posee.

De igual forma, es necesario resaltar la importancia de la industria de los aceites esenciales a nivel mundial con fines cosméticos, alimenticios (saborizantes, condimentos, etc) y farmacéuticos; esta es una industria creciente y que genera millones en recursos. Por tanto, es necesario aportar diversificando y ampliando los campos de aplicación de la Fitoquímica por lo cual, el presente estudio fue desarrollado buscando contribuir con los estudios de aceites esenciales que realiza el Grupo de Investigación en Fitoquímica de la Universidad Javeriana y Grupo de investigación de productos naturales y contaminación ambiental de la universidad el Bosque, cuyo fin es indagar sobre los aceites esenciales de plantas dentro de géneros que han sido poco estudiados, pero que presentan un gran potencial biológico de acuerdo con el uso que se le ha dado por parte de comunidades indígenas como los Nukak (Cardenas y Politis, 2000).

Muchos aceites esenciales estudiados se encuentran distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen las Compuestas, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Umbelíferas, etc. Se les puede encontrar en diferentes partes de la planta: en las hojas (ajenjo, albahaca, buchú, cidrón, eucalipto, hierbabuena, limoncillo, mejorana, menta, pachulí, quenopodio, romero, salvia, toronjil, etc.), en las raíces (angélica, asaro, azafrán, cálamo, cúrcuma, galanga, jengibre, sándalo, sasafrás, valeriana, vetiver, etc.), en el pericarpio del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.), en las semillas (anís, cardamomo, eneldo, hinojo, comino, etc.), en el tallo (canela, caparrapí, etc.), en las flores (arnica, lavanda, manzanilla, piretro, tomillo, clavo de olor, rosa, etc.) y en los frutos (alcaravea, cilantro, laurel, nuez moscada, perejil, pimienta, etc.). Los monoterpenoides se encuentran principalmente en plantas de los órdenes Ranunculales, Violales y Primulales, mientras que son escasos en Rutales, Cornales, Lamiales y Asterales. Por el contrario, los sesquiterpenoides abundan en Magnoliales, Rutales, Cornales y Asterales. Aunque en los aceites esenciales tanto los mono-, los sesquiterpenos y los fenilpropanos se les encuentra en forma libre, más recientemente se han investigado los que están ligados a carbohidratos, ya que se considera que son los precursores inmediatos del aceite como tal. Las especies *Conyza bonariensis*, *Gnaphalium pellitum* y *Achyrocline satureioides* denominadas vira-vira y denominadas por García Barriga las plantas del cáncer, en la actualidad sus aceites esenciales han sido pocos estudios.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la composición química por CG-EM y evaluar la actividad antibacteriana y antioxidante de los aceites esenciales de *Conyza bonariensis*, *Gnaphalium pellitum* y *Achyrocline satureioides*

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Extraer los aceites esenciales de las hojas de *Conyza bonariensis*, *Gnaphalium pellitum* y *Achyrocline satureioides*, por las técnicas de arrastre por vapor e hidrodestilación.

Identificar los componentes de los aceites esenciales por CG-EM, obtenidos de las hojas de *Conyza bonariensis*, *Gnaphalium pellitum* y *Achyrocline satureioides*.

Determinar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Conyza bonariensis*, *Gnaphalium pellitum* y *Achyrocline satureioides* por el método de perforación en placa frente a dos bacterias Gram positiva y tres bacterias Gram negativas. (*Staphylococcus aureus* Gram (+), *Staphylococcus epidermidis* Gram (+), *Pseudomona aeruginosa* Gram (-) , *Proteus mirabilis* Gram (-), y *Escherichia coli* Gram (-).

Evaluar la actividad antioxidante de los aceites obtenidos de *Conyza bonariensis*, *Gnaphalium pellitum* y *Achyrocline satureioides* por el método DPPH[•] .

INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas medicinales nació desde el comienzo de la historia del hombre, desde la antigüedad hasta inicios del siglo XIX en diferentes civilizaciones se usaron las plantas para diferentes enfermedades, esto por ensayo y error, hasta convertirse en una tradición. Esta práctica ancestral fue transmitida y perfeccionada a través de generaciones y actualmente se conoce como medicina tradicional o folclórica (Lizcano y Vergara, 2008).

Los aceites esenciales han sido empleados por el hombre desde la antigüedad. Hacia el año 4500 antes de Cristo se encuentran reportes de su empleo por parte de los médicos o curanderos Chinos de la época, esto con fines terapéuticos, de la misma forma los Egipcios quienes también los empleaban para embalsamar. En Grecia grandes médicos como Hipócrates y Galeno empleaban hierbas aromáticas y aceites esenciales para tratar a sus pacientes, en las comunidades indígenas el uso de aceites esenciales ha llegado hasta nuestros días como un legado que se pasa de generación en generación desde épocas inmemorables, por tanto es importante que la comunidad científica recopile este conocimiento y profundice en el mismo generando desarrollos que puedan beneficiar a la humanidad y a su entorno. (Rivera, 2009);

Colombia es catalogado como uno de los países más diversos, se caracteriza por tener una gran variedad de flora silvestre y de las 260000 especies registradas en el mundo, el 19,23 % de estas se encuentran en Colombia, de estas aproximadamente la tercera parte son endémicas (Calderón et al., 2007). Se calcula que los páramos Colombianos albergan alrededor de 118 familias, 566 géneros y 3379 especies, equivalentes a cerca del 12% de la flora calculada para todo el país. Estos ecosistemas están ubicados entre los 3100 y 4000 metros sobre el nivel del mar y se caracterizan por recibir luz solar todo el año con una calidad única por su ubicación geográfica en la zona ecuatorial, además son lugares especialmente estratégicos por su potencial hídrico y debido a su baja temperatura promedio lo cual permite el desarrollo de especies vegetales exclusivas de la zona (Ortiz, 2009)

Dentro de las especies nativas se encuentra el grupo de las Asteráceas, antes llamada Compositae o Compuestas, es una familia de plantas herbáceas anuales o perennes, que se caracterizan por agrupar las flores en una inflorescencia compuesta o capítulo, rodeadas de una o varias filas de brácteas (involucro), con receptáculo plano o convexo,

rara vez cilíndrico, frecuentemente provisto de brácteas, escamas o pelos en su interior. Las flores son pequeñas, hermafroditas o, en ocasiones, funcionalmente unisexuales o estériles; de simetría actinomorfa o zigomorfa, pentámeras; gamopétalas; cáliz nulo o formado por pelos simples, plumosos o setiformes, por escamas o por una pequeña corona membranácea. (Watson, et al 2007).

El aceite esencial es una mezcla de componentes volátiles producto del metabolismo secundario de las plantas en cuya composición interviene una porción de hidrocarburos del tipo terpenos (Bandoni, A. et al 2000), junto con otros compuestos casi siempre oxigenados (alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y compuestos fenólicos) que son los que le confieren a los aceites el aroma que los caracteriza (Stashenko, 2003). Los aceites se encuentran contenidos en glándulas o vesículas secretoras inmersas en los tejidos de las hojas, flores, corteza (pericarpio) y semillas de los frutos de muchas especies y son producidos por diversos fines; por un lado protegen a la planta de plagas, enfermedades e inclusive de la invasión de otras plantas y también para atraer insectos y aves polinizadoras. Estas cualidades de protección y atracción, se ven reflejadas en propiedades del tipo antisépticas, antiinflamatorias, antidepresivas, afrodisíacas entre otras, presentes en mayor o menor grado en la totalidad de los aceites (Morales 1996; Smith, et al 1998), radicando en ello su gran importancia dentro de las industrias farmacéuticas, de fragancias, aromas y sabores.

En el presente estudio se hace una breve descripción del estado del arte, sobre los aceites esenciales, el género *Asteraceae*, la descripción taxonómica de la especie objeto de estudio y sus tres representantes; luego se abordan los estudios químicos y biológicos realizados sobre el género, finalizando con una descripción de la metodología empleada para el desarrollo del estudio, los resultados hallados y las conclusiones a las que se llegó a través del mismo.

1 ESTADO DEL ARTE

1.1 Aceites esenciales.

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, las cuales en algunos casos le proporcionan el aroma a las plantas, por esto son importantes para la industria cosmecéutica (perfumes y aromatizantes), nutracéutica (condimentos y saborizantes) y farmacéutica. En su gran mayoría estos aceites son de olor agradable, aunque también encontramos algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los del ajo y la cebolla (Martínez, A, 2003).

1.1.1 Clasificación.

Según Martínez, A., los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios: Consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios. “De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas; las esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente, los bálsamos son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización; son ejemplos el bálsamo de copaiba, del Perú, el bálsamo de Benjuí, de Tolú, Estoraque, etc. Las oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas como el caucho, la gutapercha, el chicle y la balata entre otras” (Martínez, A, 2003).

Sin embargo, teniendo en cuenta su origen estos aceites se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos. En cuanto a los naturales, son los que se obtienen directamente de la planta, sin ningún tipo de modificación, con rendimientos tan bajos que resultan muy costosos. Los artificiales se producen por medio de mezclas o enriqueciendo la esencia con uno o varios de sus componentes, un ejemplo típico es la mixtura de esencias de rosa, geranio y Jasmín, enriquecidas con linalool. Existe otro tipo de aceites sintéticos, los cuales son los elaborados por la combinación de sus componentes, que a su vez son sintetizados químicamente, estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa, etc.) (Martínez, A, 2003).

Otra clasificación se da por la composición química de las sustancias mayoritarias presentes en el aceite; es decir aquellos ricos en monoterpenos se denominan aceites

esenciales monoterpenoides (p.ej. hierbabuena, albahaca, salvia, etc.); en sesquiterpenos son los aceites esenciales sesquiterpenoides (p.ej. copaiba, pino, junípero, etc.) y en fenilpropanos son los aceites esenciales fenilpropanoides (p.ej. clavo, canela, anís, etc.) (Martínez, A ,2003).

1.1.2 Distribución y estado natural.

Martínez, A., en 2003 escribió “Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen las *Compuestas*, *Labiadas*, *Lauráceas*, *Mirtáceas*, *Pináceas*, *Rosáceas*, *Rutáceas*, *Umbelíferas*, etc.”. (Martínez, A. 2003). “Se les puede encontrar en diferentes partes de la planta: en las hojas (ajenjo, albahaca, cidrón, eucalipto, hierbabuena, limoncillo, mejorana, menta, pachulí, quenopodio, romero, salvia, toronjil, etc.), en las raíces (azafrán, cálamo, cúrcuma, galanga, jengibre, sándalo, sasafrás, valeriana, etc.), en el pericarpio del fruto (naranja, limón, mandarina, etc.), en las semillas (anís, cardamomo, eneldo, hinojo, comino, etc.), en el tallo (canela, caparrapí, clavo de olor, etc.), en las flores (árnica, lavanda, manzanilla, tomillo, rosa, etc.) y en los frutos (alcaravea, cilantro, laurel, nuez moscada, perejil, pimienta, etc.)” (Stashenko, E 2003).

1.2 Aspectos botánicos de la familia *Asteraceae*.

1.2.1 Ecología.

Asteraceae, antes llamada Compositae o Compuestas, es una familia de plantas herbáceas anuales o perennes, que se caracterizan por agrupar las flores en una inflorescencia compuesta o capítulo, rodeadas de una o varias filas de brácteas (involucro), con receptáculo plano o convexo, rara vez cilíndrico, frecuentemente provisto de brácteas, escamas o pelos en su interior. Las flores son pequeñas, hermafroditas o, en ocasiones, funcionalmente unisexuales o estériles; de simetría actinomorfa o zigomorfa, pentámeras; gamopétalas; cáliz nulo o formado por pelos simples, plumosos o setiformes, por escamas o por una pequeña corona membranacea (Torres F, 2007).

En la naturaleza los aceites esenciales juegan un papel muy importante ya sea como antibacterial, antiviral, antifungica, insecticida o repeliendo algunas plagas o reduciendo el apetito de la plaga y de esta forma protegiendo a la planta (Guerrero 2012). La desventaja en algunas oportunidades es que repele también algunos insectos que favorecen la dispersión de polen y semillas. Los aceites esenciales son extraídos de diferentes plantas, las cuales se localizan en zonas cálidas o en países ubicados en la

zona intertropical, estas plantas son una riqueza de la farmacéutica tradicional. Los aceites esenciales son líquidos volátiles, límpidos y rara vez coloridos, son lípidos solubles en solventes orgánicos, con una baja densidad comparada con la densidad del agua, estos aceites pueden ser sintetizados en diferentes partes de la planta ya sea la raíces, el tallo, las hojas, flores, frutos, en algunas ocasiones en las semillas. (Masotti, et al 2003; Angioni , et al 2006).

Se conocen numerosos métodos para extraer los aceites esenciales, entre ellos sobresalen: compresión, extracción arrastre por vapor, hidrodestilación, extracción por fluido supercrítico, enflurage y extracción con baja o alta presión. Los métodos de extracción se aplican según, calidad, cantidad, composición, clima, composición del suelo, órgano de la planta, edad y etapa del ciclo de la planta.

1.2.2 Taxones incluidos en las Asteráceas.

La familia de las asteráceas comprende cerca de 1500 géneros y aproximadamente 23.000 especies, distribuidas en las zonas intertropicales y zonas templadas. Las plantas de este género son usadas como antiinflamatorio y antianémico y también antidiabéticos y se usa comúnmente para tratamientos de enfermedades gastrointestinales. (Heiden et al., 2007; Katinas et al., 2007).

El género *Achyrocline* (Asteraceae) comprende unas 15-20 especies y ocurre principalmente en América del Sur y América Central, ubicada también en África tropical y zonas montañosas de la Isla de Madagascar (Giangualani, R.A. 1976; Nesom, G 1990). Esta especie ha sido estudiada en Argentina y últimamente en Colombia, relacionado en el estudio de la fitocenosis de las plantas del paramo de la Sierra Nevada de Santa Marta se han determinado ocho especies, distribuidas principalmente en el norte y centro del país (Pinto et al 2010.). Es bien conocida la dificultad que presenta la correcta identificación de éstas especies, dado que poseen caracteres morfológicos muy semejantes entre sí (Giangualani, 1976). La especie más utilizada, debido a la amplia distribución en sur américa y de mayor interés comercial es *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. Es una planta herbácea, perenne, tomentosa, que se conoce con los nombres vulgares de “marcela”, o “mácela” (Retta et al 2009).

1.2.3 Descripción de las plantas del Estudio.

Conyza Bonariensis. (*Conyza hispida*, *Erigeron Cripus*, *Erigeron Bonariensis*). Es una de las especies de las asteráceas, (Mondragón, P 2004). Según Kunt se conoce con el



Fig. 1 *Conyza bonariensis*.

nombre de *Conyza hispida*. También se le conoce con el nombre vulgar de yerba carnicera o mata negra. Para reconocer la especie se debe observar que es una planta pilosa, el tallo tiene dos tipos de pelos, cortos y pegados. Cabezuelas maduras muy unidas o agrupadas, con una inflorescencia (característico de las Asteráceas) más bien abiertas, por sus hojas verde oscuras y abiertas de aproximadamente 1 cm de diámetro (Rzedowski, y Rzedowski, 2003).

Achyrocline satureioides. (Vira Vira, yerba del chivo). Se conoce también con el nombre vulgar de Marcela es una especie perteneciente a la familia de las *Asteráceas*, tribu Inuleae. Es una planta sufrútice, perenne, lanosa, aromática. Las hojas son simples, alternas, sésiles, enteras, lineares a lineal - lanceoladas, agudas, de borde liso, de 5 cm de largo y hasta 4 mm de ancho, pinatinervias, lanosas. Las flores se disponen en capítulos pequeños, numerosos, cilíndricos, que forman densos glomérulos terminales de color gris amarillento o amarillo dorado. Las flores marginales femeninas son pocas, poseen corola filiforme dentada o 4-5 partida en el ápice; las centrales son sólo 1-2, perfectas, con corola tubulosa estrecha, pentadentada en el limbo. El fruto es un aquenio con vilano. Es un arbusto que puede alcanzar dos metros de altura su ciclo es anual, las flores tienen capítulo compuesto (entre 9 a 15 capítulos por flor) de aproximadamente 2 cm de diámetro, (Gattuso y Gattuso 1998), la floración se presenta entre febrero y marzo, las hojas son delgadas y alargadas de tonalidad verde cenizo.



Fig. 2 *Achyrocline satureioides*

Gnaphalium Pellitum Kunth. (*Achyrocline alata* (Kunth), Vira Vira). Hierba de 20 a 40 cm de altura, tallos con muchos pelos, así como sus hojas, inflorescencia con capítulos terminales, sus hojas son anchas aproximadamente 2 cm por 10 a 15 cm de largas.



Fig. 3. *Gnaphalium pellitum*

Un ejemplar de cada especie fue clasificado por el herbario de la Universidad Nacional y almacenado con el número de colección: *Conyza bonariensis*. 582520, *Gnaphalium pellitum*. 582791. *Achyrocline satureioides* 582522. (Ver Anexo 4).

1.2.4 Empleo tradicional de las especies botánicas en estudio.

Conyza bonariensis. (*Conyza hispida*, *Erigeron Cripus*, *Erigeron Bonariensis*). Usos Medicinal, principalmente como astringente, antidiarreica, diurética, insecticida, parasiticida, tratamiento para enfermedades venéreas, enfermedades del hígado y urinarias y antirreumáticas. (Carrizo, et al 2002). Se debe tener en cuenta que esta planta ha presentado una buena tolerancia a los herbicidas. (Papa, 2002).

Achyrocline satureioides. (Vira Vira, yerba del chivo). Usos medicinales. En infusión tiene capacidad antiinflamatoria, digestiva, estimulante y antiespasmódica. (Martino et al. 1989). Según un estudio realizado recientemente tiene propiedades: hipo glicémica, pectoral, antigripal, para las infecciones intestinales, para la disentería, y también en forma externa como hepática y antiinflamatoria, la parte utilizada es la parte aérea y debe ser en inflorescencia. (Martinez 2005)

In vitro se ha determinado actividad antiviral, inmunomoduladora, mutagénica, antimicrobiana y también antiespasmódica. (Bettega et al 2004).

Gnaphalium pellitum kunth. (*Achyrocline alata*, Vira Vira) Se usa toda la planta, la infusión es utilizada como antitusígeno y cuando presenta dolores reumáticos (Arteta 2008).

1.3 Descripción taxonómica de las plantas del estudio.

En las tablas 1,2,3 se presenta una breve descripción de la taxonomía de las plantas.

Tabla 1 Clasificación científica de *Conyza Bonariensis*

Reino	Plantae
Clase:	Equisetopsida C. Agardh
Subclase:	Magnoliidae Novák ex Takht
Orden:	Asterales Enlace
Familia:	Asteraceae Bercht & j. Presl
Género:	<i>Conyza</i> Less
Especie.	<i>C bonariensis</i>

Tabla 2 Clasificación científica de *Achyrocline satureioides*

Reino	Plantae
Clase:	Equisetopsida C. Agardh
Orden:	Asterales Enlace
Familia:	Asteraceae Bercht .
Género:	Achyrocline.
Especie:	Achyrocline satureioides

Tabla 3 Clasificación científica de *Gnaphalium pellitum* Kunth.

Reino	Plantae
Clase:	Equisetopsida C.Agardh
Orden:	Asterales Enlace.
Familia:	Asteraceae Bercht & J. Pesl
Género:	Gnaphalium L .
Especie:	Gnaphalium Pellitum

Tomado de WWW. Tropicos.org. Jardín Botánico de Missuei. 11 de junio 2014.

1.3.1 Composición química reportada en otros estudios.

Conyza bonariensis. (*Conyza hispida*, *Erigeron Cripus*, *Erigeron Bonariensis*). Compuestos aislados de la *Conyza bonariensis* son el cumuleno y flavonoides, El ácido cafeoilquínico se ha extraído en un porcentaje de 6,9 del extracto seco. (Martino et al 1989).

Achyrocline satureioides. (Vira Vira, yerba del chivo) Los compuestos que se han aislados son flavonoides, ácido cafeico, calleriarina, y el a protocatequico. El ácido cafeoilquínico se extrajo en un porcentaje de 22,3 del extracto seco. (Martino et al 1989). También se han logrado aislar luteolina, quercetina, scoparol, 5,8-dihidroxi-3,7-dimetoxiflavona, galaginina, galaginina- 3-metil éter, quercetina-3-metil éter, así como, 3-metoxi-quercetina y scoparona. Esencia: se caracteriza por un alto contenido de α y β pineno. Tambien se ha encontrado limoneno, cis- β -ocimeno, trans- β -ocimeno, oxicariofileno, β -cariofileno y α -humuleno.(Labuckas et al 1999)

In vitro se ha determinado actividad antiviral, inmunomoduladora, mutagénica, antimicrobiana y también antiespasmódica.(Bettega et al 2004).

Gnaphalium pellitum kunth. (*Achyrocline alata* Kunth). La sustancia química alfa-pineno es un componente de muchos aceites esenciales y tiene propiedades anti-inflamatorias y antimicrobianas. Hierbas homeopáticas recursos típicamente contienen alfa-pineno que se encuentra en los aceites vegetales y resinas. Trementina, la resina destilada de pinos, fue en un tiempo un tratamiento médico ampliamente reconocido. Las bayas de enebro, aceite de eucalipto y aceite de árbol de té, todos contienen este compuesto químico. (Milli D, 2000). El alfa-pineno es conocido como un terpeno, la estructura consta de 10 átomos de carbono configurados en dos unidades de isopreno unidas cabeza a la cola. La cantidad de alfa-pineno producida depende de la temperatura y la luz solar disponible. (Alvarez, 2012). Torrenegra y colaboradores en el 2001 identificaron el 13-epi-Cicloesclareol, un nuevo diterpeno de tipo labdano con un anillo de ciclopropano ha sido aislado a partir de *Gnaphalium pellitum* así como de la *Gnaphalium graveolens*. La elucidación de la estructura se logró mediante métodos espectroscópicos. Los conocidos terpenos ácido (-)-16-kauren-19-oico, ácido (-)-11 β -acetoxi-16-kauren-19-oico, 13-epi-sclareol y las mezclas de sitosteroles y estigmasterol fueron también separadas. (Torrenegra 2001)

1.4 Actividad biológica reportada en estudios previos de este género.

En la especie *Conyza bonariensis*, se han realizado estudios a los extractos etanólicos, presentando un efecto antiinflamatorio y antimicótico. (Manzano 2001). También se han realizado estudios en Argentina de estas plantas que presentan actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis*, por lo cual se puede presentar usos etnomédicos relacionados con afecciones dérmicas y urinarias producidas por estas bacterias (Lujan, M. C., Perez Corral C, 2008). Según estudios presentados por el grupo de la facultad de farmacia y bioanálisis de la Universidad de los Andes de Mérida Venezuela. Esta planta se usa contra la malaria, como antiinflamatorio, para el dolor de cabeza y para enfermedades digestivas. (Araujo. L, et al. 2013). Manzano y colaboradores en el 2011, realizaron la evaluación química del aceite de hojas de *C. bonariensis* de Ecuador, emplearon 2 tinturas a 50 % con etanol a 70 y 90 % de hojas secas. Realizaron un fitoquímico a través del sistema acoplado de cromatografía gaseosa-espectrometría de masas y determinaron el efecto antimicótico mediante inhibición de dilución en placa con siembra en superficie por diseminación, y antiinflamatorio en el modelo de edema de la oreja inducido por aceite de Croton en ratones albinos de la línea OF1. el estudio fitoquímico mostró presencia de aceites esenciales, triterpenos-esteroides, compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, antocianidinas, saponinas y compuestos reductores. Se determinó estructuras a 32 componentes del aceite esencial extraído de las hojas y el sesquiterpeno: trans- β -farneseno resultó el componente mayoritario con 70,82 %, este compuesto se informa

por primera vez en esta especie. El extracto hidroalcohólico (25 µL a cada lado de las orejas tratadas) inhibió significativamente la inflamación comparado con bencidamina. los extractos hidroalcohólicos mostraron efecto antiinflamatorio en las condiciones experimentales del estudio y se determinó la composición química del aceite de hojas de *C. bonariensis*. Martinez y colaboradores en el 2007 determinaron la composición química de los aceites esenciales (AEs) de las hojas de 10 plantas aromáticas colombianas. Los AEs se aislaron empleando la técnica de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD) y la identificación de los componentes de los AEs se realizó mediante el análisis por cromatografía de gases espectrometría de masas (GC-MS), utilizando dos columnas (DB-5 y DB-Wax). La identificación de los compuestos se basó en los índices de Kovàts y en la comparación de los espectros de masas con los de las bases de datos QuadLib2004, NIST 2002, Wiley 138k. Zapata y colaboradores en el 2010, Evaluaron la actividad antimicótica y el efecto citotóxico de 15 aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. La actividad antimicótica se evaluó con las cepas *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258, *Aspergillus flavus* ATCC 204304 y *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305 de acuerdo con las técnicas EUCAST y CLSI M38-A para levaduras y hongos filamentosos, respectivamente. La actividad citotóxica se evaluó mediante la técnica del MTT en la línea celular Vero. Encontraron que los aceites de las plantas *Achyrocline alata* y *Baccharis latifolia* fueron los únicos activos contra *A. fumigatus* (media geométrica de la concentración mínima inhibitoria=78,7 y 157,4 µg/ml, respectivamente). En contraste, no se evidenció actividad de los aceites contra especies de *Candida*. Además, estos aceites no fueron citotóxicos en las células Vero. Concluyeron que los aceites de *A. alata* y *B. latifolia* podrían ser candidatos para la desinfección de ambientes hospitalarios y para la inhibición de formación de biopelículas por *A. fumigatus*.

Para la especie *Achyrocline satureioides*, se han realizado estudios antimicrobianos y antiviral frente *Staphylococcus* y las infusiones obtenidas de esta planta son utilizadas como digestivo, sedativo. (Calvo. D, et al. 2006), Olivera y colaboradores 1988, en inflorescencias de *Achyrocline Satureioides* (Lam.) DC. y que son utilizadas como remedios en la medicina popular para el tratamiento de una variedad de enfermedades humanas, en particular los del tracto gastrointestinal. Diferentes extractos de inflorescencias han sido probados para anti-inflamatorio, analgésico, antiespasmódico y actividades sedantes. Los extractos acuosos (maceración y decocción) y macerado etanólico exhibieron una inhibición del edema de pata de rata inducido por carragenina en un rango de dosis de 75-500 mg kg⁻¹ ip, y también mostraron un efecto analgésico con el ensayo de retorcimiento inducido por ácido acético en ratones. La propulsión gastrointestinal de una suspensión de carbón no se vio afectada de manera significativa por cualquier extracto, a una dosis de 200 mg kg⁻¹ po, en ratones. La decocción acuosa

aumento del tiempo de dormir inducida por pentobarbital, a dosis de 200 y 500 mg kg⁻¹ ip y p.o., en ratones. El macerado inhibió contracciones inducidas por acetyleholine etanólicos, la histamina, la noradrenalina y cloruro de bario en cuatro tejidos musculares lisas diferente. Las actividades antiespasmódicas y anti-inflamatorias se reprodujeron con quercetina, luteolina y quercetina éter 3-metilo, flavonoides que han sido aisladas a partir de esta planta. También se realizó una evaluación parcial de la toxicidad de los extractos. Los efectos farmacológicos ensayados se discuten en relación a los componentes químicos de esta planta y su uso popular en trastornos gastrointestinales, y condiciones inflamatorias podrían estar relacionadas con la presencia de los flavonoides. Kadarian y colaboradores en 2002 reportaron en las Partes aéreas de *Achyrocline satureioides* (Lam) DC (Asteraceae) se utilizan en la medicina popular como infusiones o cocimientos para el manejo de varias enfermedades incluyendo trastornos gastrointestinales y hepáticos. Estos datos y la presencia de flavonoides y derivados cafeoil nos han llevado a estudiar su hepatoprotector y actividades coleréticos. La actividad hepatoprotectora se evaluó en la bromobenzene- (BB-) modelo hepatotoxicidad inducida en ratones a través de la medición de los niveles séricos de alanina-aminotransferasa (ALT) y aspartato transaminasa (AST), sustancias de ácido tiobarbitúrico (TBARS) reaccionar y los niveles de glutatión. El extracto acuoso de las partes aéreas de *A. satureioides* administrados antes de BB, a la dosis de 300 mg kg⁻¹p.o., Demostró una inhibición significativa (P <0,01) en el aumento BB de ALT y AST hígado y en el BB- inducida por aumento de hígado contenido de TBARS. También fue capaz de aumentar significativamente (P <0.05) los niveles de agotamiento de glutatión hepático. Además, a la misma dosis, se encontró un aumento significativo (P <0,01) en el flujo de bilis de ratas. Los resultados obtenidos con el extracto acuoso de *A. satureioides* apoyan su uso en la medicina popular como un agente hepatoprotector y digestivo, y los efectos pueden ser mediados a través de la actividades antioxidantes y colerético. Lopez y colaboradores en 1996, reportaron en *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. (Compositae), conocida popularmente como "marcela", es una especie vegetal ampliamente comercializada en la República Argentina, Uruguay, Brasil y Paraguay debido a su uso medicinal como colagogo-colerética. En este trabajo se analizaron por HPLC, utilizando un detector UV con arreglo de fotodiodos, el contenido en derivados cafeoil químicos presentes en ocho muestras obtenidas en el comercio, comparándolas con una muestra patrón. Se determinó el contenido en estos compuestos debido a su reconocida acción colagogo-colerética. Arredondo y colaboradores en el 2004 indican que los antioxidantes dietéticos pueden influir en la incidencia de enfermedades neurodegenerativas. Entre ellos se han propuesto flavonoides ser citoprotectores efectivos. En consecuencia, las hierbas con una alta concentración de estos compuestos como son *Achyrocline satureioides*, *Ginkgo biloba* y *Epilobium parviflorum* son de especial interés. En este contexto se realizó un estudio comparativo de la capacidad citoprotectora de las infusiones de las tres plantas

frente a un insulto oxidativo. Por lo tanto, la actividad citoprotectora de cada infusión contra las lesiones a las células PC12 se puso a prueba y la capacidad antioxidante se evaluó mediante el ensayo de blanqueo ABTS + radical. Flavonoides libres y glicosilados que figuran en las infusiones fueron identificados por HPLC y el efecto citoprotector de algunos de estos flavonoides individuales se ensayó. El análisis del contenido de flavonoides de las infusiones reveló diferentes perfiles. *Epilobium parviflorum* infusión mostró la mayor capacidad antioxidante pero sólo infusión *Achyrocline satureioides* resultó ser citoprotector. Por otra parte, la quercetina flavonoides libres y luteolina contenida en esta infusión también eran citoprotector. En conclusión, la capacidad captadora de radicales libres no se correlacionó con el perfil citoprotector de las infusiones. La mezcla especial de flavonoides *Achyrocline satureioides* no glicosilados podría ser una pista para explicar el efecto único de esta planta. Polydoroa y colaboradores en el 2004, compararon las propiedades antioxidantes de cinco extractos diferentes de diferente composición obtenida de inflorescencias *Achyrocline satureioides* '(Compositae), un popular brasileña hierba medicinal ampliamente utilizada. Todos los extractos presentaron potencial antioxidante significativo identificado por el ensayo TRAP, que aumentó en presencia de plasma humano. Caracterización del contenido de flavonoides en cada extracto mostró que los extractos FDP80 (etanol 80 %) y FFR (fracción flavonoide enriquecido) contenían un mayor contenido de flavonoides. La citotoxicidad de los extractos como se determina en cultivo de células de Sertoli mostró que FDP80 y FFR eran altamente tóxicos en la mayoría de las concentraciones ensayadas. Los extractos indujeron un aumento significativo en los niveles de peroxidación de lípidos en las células de Sertoli. Estos resultados sugieren que los extractos de hierbas medicinales que contienen concentraciones más altas de flavonoides y muestra una mayor protección antioxidante in vitro no siempre pueden producir el mayor beneficio.

Para la *Gnaphalium pellitum*. El limoneno es uno de los Compuestos químico que se encuentra en las cáscaras de los cítricos y en otras plantas, este se utiliza para elaborar medicinas, el limoneno se le atribuye propiedades causante de la pérdida de peso, prevenir el cáncer, el tratamiento del cáncer y el tratamiento de la bronquitis. (Ortiz, 2007), Callacondo-Riva y colaboradores 2008, evaluaron la actividad citotóxica de extractos etanólicos de raíces, tallos, hojas y flores de *Gnaphalium spicatum* sobre algunas líneas celulares tumorales humanas. Materiales y métodos. Las líneas celulares HT-29, H-460, MCF-7, M-14, PC-3, DU-145, K-562, y 3T3, fueron expuestas a cuatro concentraciones de extractos etanólicos de raíces, tallos, hojas y flores de *Gnaphalim spicatum*, asimismo, a diferentes concentraciones de cisplatino, que se usó como control positivo. Se halló los porcentajes de crecimiento en 48 horas. Luego se

determinó la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) mediante análisis de regresión lineal, el índice de selectividad de cada muestra y finalmente, la relación dosis-respuesta entre las concentraciones de los extractos y cisplatino, con los porcentajes de crecimiento. Resultados. El extracto etanólico de las raíces de *Gnaphalium spicatum* mostró mayor actividad citotóxica en la líneas celulares MCF-7 y K-562. Los IC₅₀ en µg/mL fueron de 98 (r= -0,98 p < 0,01) y 46 (r= -0,97 p < 0,01), respectivamente. Asimismo, su citotoxicidad en la línea celular 3T3 fue de 215 (r= 0,97 p <0,01). Los IC₅₀ del cisplatino en µg/mL fueron de 2 (r=-0,96 p < 0,01), 7,7 (r=-0,98 p<0,01) y 3 (r=-0,97 p<0,01), para MCF-7, K-562 y 3T3, respectivamente. Los índices de selectividad del extracto de raíces y cisplatino fueron 2,2 y 0,3 para MCF-7, y 4,7 y 1,5 para K-562, respectivamente. Los extractos de tallos, hojas y flores obtuvieron IC₅₀ > a 0,250 mg/mL en todas la líneas celulares evaluadas. Conclusiones. Los extractos etanólicos de tallos, hojas y flores de *Gnaphalium spicatum* no mostraron actividad citotóxica en este bioensayo. Los extractos de raíces mostraron citotoxicidad en las todas las líneas celulares tumorales, excepto en M-14. Además fueron menos citotóxicos en relación al cisplatino en la línea celular 3T3. Alarcón y Hernandez en el 2013 en el género *Gnaphalium*, conocido popularmente como vira-vira, ampliamente reconocido por sus propiedades antineoplásicas y que la usan en su mayoría para tratar problemas de la próstata, en su estudio determinaron la actividad antioxidante y citotóxica en los extractos totales y fracciones obtenidas en hojas e inflorescencia de la especie *Gnaphalium Meridanum*, *Gnaphalium* cf .*Polycephalum* Michx.)por método de extracción sólido -líquido en el equipo de reflujo asistido soxhlet empleando solventes de polaridad creciente. La actividad antioxidante de los extractos, fracciones y de los controles positivos TROLOX y quercetina se evaluó empleando el ensayo de captación del radical libre DPPH[•] en solución metanólica, midiendo por espectrofotometría. La actividad citotóxica de los extractos y fracciones se determinó con el ensayo de reducción del MTT empleando la línea celular de macrófagos murinos J-774 con el fin de evidenciar la mortalidad celular y el posible potencial de la especie como activo antineoplásico. Se encontró que la inflorescencia es potencialmente antioxidante, con un 0,95 % de captación relativa del radical por cada ppm de la fracción etanólica, y positiva para el ensayo de citotoxicidad ante células con propiedades tumorales obteniendo como resultado un DL 50 de 120,4 ppm para la fracción en acetato de etilo.

2 METODOLOGÍA

Esta investigación se abordó desde dos aspectos, uno químico y otro biológico. Con el estudio químico se pretendió extraer e identificar los aceites esenciales presentes en hojas de *Conyza bonariensis*, *Gnaphalium pellitum* y *Achyrocline satureioides*, con el estudio biológico se buscó valorar la acción antioxidante y antimicrobiana de los aceites esenciales obtenidos. Los reactivos empleados para el desarrollo del estudio son grado analítico.

2.1 Recolección y preparación del material vegetal.

Las tres diferentes plantas estudiadas en este trabajo, fueron recolectadas en

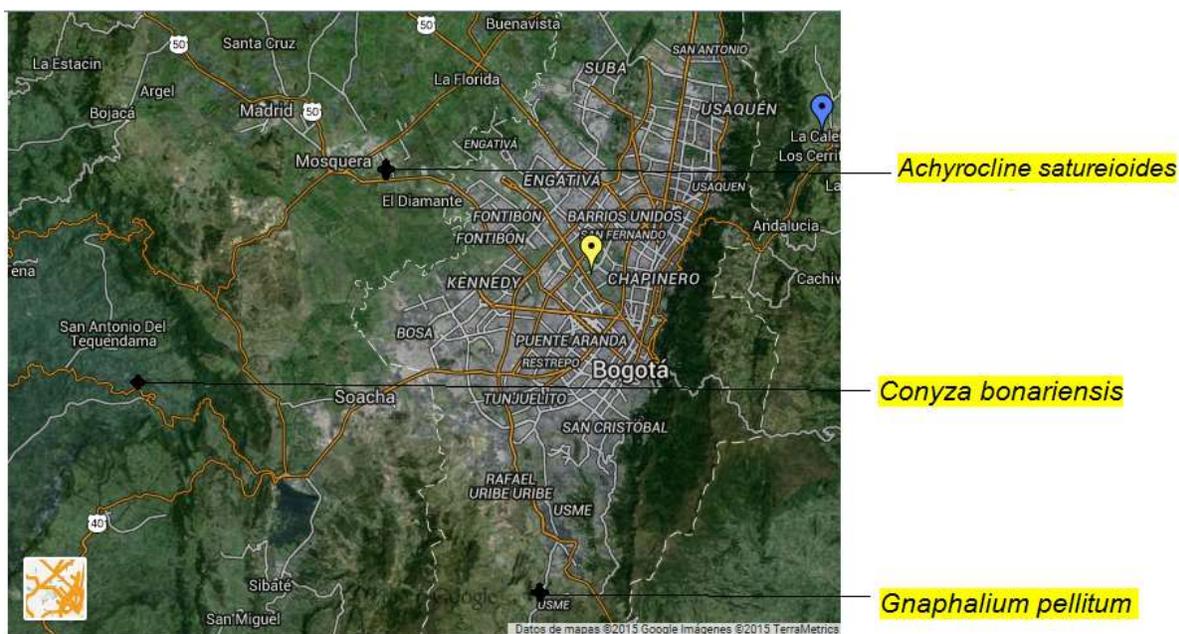


Fig. 4 Mapa ubicación plantas. Tomado de Google

alrededores de Bogotá capital de Colombia, la *Achyrocline satureioides* fue colectada en Funza, (Cundinamarca, N 04° 43,751, W 74° 09,594. Altura 2477 msnm), la *Conyza bonariensis* en la vereda la esperanza. (Mesitas, N 4° 30, 892 W 74° 21,240. Altura 2410 msnm) y la *Gnaphalium pellitum* en Usme (Cundinamarca, N 04° 21,547 W 74° 11,517, Altura 3305 msnm) cercanías al paramo de Sumapaz.

2.2 Métodos de extracción.

Los métodos de extracción de aceites esenciales más comunes son: destilación por arrastre de vapor, expresión, hidrodestilación, extracción destilación simultánea y extracción con fluido supercrítico; existen otros no tan comunes, (ver fig. 5), como las variantes de las técnicas anteriormente descritas, donde el equipo de calentamiento normal es sustituido por un equipo microondas o un ultrasonido. (Albarracín et al 2005).

Métodos de extracción de mezclas aromáticas			
Metodo	Procedimiento	Productos obtenidos	
1 Métodos directos	1.1 Extrusión	1.1.1 Compresión de cáscaras	Aceites esenciales cítricos
		1.1.2 Raspado de cáscaras	
	1.2 Macerado	1.2.1 Lesiones mecánicas en cortezas	gomas, resinas, bálsamos
2. Destilación	2.1 Directa		Aceites esenciales y aguas aromáticas
	2.2 Arrastre con vapor de agua (directo indirecto, a presión, a vacío)		
	2.3 Destilación-maceración (liberación enzimática de agliconas en agua caliente)		
3. Extracción con solventes	3.1 Solventes volátiles	3.1.1 En caliente	infusiones y resinoides alcohólicos
		3.1.2 En frío	concretos y absolutos
	3.2 Solventes fijos (grasas y aceites)	3.2.1 En caliente	absolutos de pomadas
		3.2.2 En frío	absolutos de enflorados
4. Técnicas de vanguardia	4.1 utilización de ultrasonidos en el proceso extractivo de hidrodestilación		
	4.2 Extracción por microondas		
	4.3 Extracción con fluidos en estado supercrítico		

Fig. 5 Métodos de extracción de mezclas aromáticas.

Los métodos de extracción empleados en este trabajo fueron los siguientes:

2.2.1 Arrastre por vapor (AV).

La destilación de arrastre por vapor ayuda a la purificación o el aislamiento de compuestos cuyo punto de ebullición es más elevado que el líquido utilizado para el arrastre, el cual tiene un punto de ebullición menor y como se trabaja a baja temperatura (siempre inferior a 100 °C si el líquido es agua) hace posible su separación de la planta.

La destilación por arrastre de vapor es una técnica de separación que permite el aislamiento de sustancias insolubles en H₂O y ligeramente volátiles de otros productos no volátiles. En el balón o recipiente de destilación se coloca agua y se calienta, en el segundo balón o compartimiento se coloca la planta de la cual se quiere extraer las sustancias volátiles e insolubles en agua (Figura 6). Finalmente, el aislamiento de los compuestos orgánicos recogidos en el matraz colector se realiza mediante una decantación o por medio de un rotaevaporador (Lamarque, et al 2008).

2.2.1.1 Fundamento teórico de la destilación por arrastre de vapor.

En una mezcla conformada por mínimo dos líquidos inmiscibles, A y B, la presión de vapor total a una temperatura determinada es equivalente a la suma de las presiones de vapor que tendrían a esta temperatura, ambos componentes sin mezclar, es decir, que cada componente ejerce su propia presión de vapor independientemente del otro ($P_T = P_A + P_B$). La mezcla hervirá a aquella temperatura en la cual la presión de vapor total sea igual a la presión externa. Además esta temperatura se mantiene constante durante toda la destilación y es inferior a la de A y a la de B. La destilación por arrastre con vapor es una técnica usada para separar sustancias orgánicas insolubles en agua y ligeramente volátiles, de otras no volátiles que se encuentran en la mezcla, como resinas o sales inorgánicas, u otros compuestos orgánicos no arrastrables. El agua es uno de los solventes por excelencia, los primeros intentos para realizar extracciones se hicieron con este solvente. Al comienzo de esta técnica para extraer la esencia de las plantas se ponía en contacto estas con agua caliente, pero la dificultad de separar después los materiales hizo que se buscasen nuevas alternativas. Posteriormente se ideó colocar las plantas en un recipiente superior para que el vapor formado en la parte inferior lo atravesase y posteriormente fuese condensado en un serpentín, así surgió el alambique para extracciones de aromas y esencias. (Lamarque et al, 2008).

La extracción funciona gracias a que, cuando el vapor entra en contacto con el material vegetal, hace que los compuestos aromáticos, que generalmente poseen un punto de ebullición más bajo que el agua, se vaporicen y sean arrastrados junto con el vapor hasta

el condensador, donde se condensan junto con el agua. También la temperatura del vapor hace que las células y las estructuras vegetales se rompan y liberen más compuestos esenciales. Esta técnica funciona para extraer aceites esenciales en general, pero no para aislar un compuesto determinado. Además pueden encontrarse algunos compuestos que puedan degradarse con la temperatura del vapor. Así que a medida que la industria de los aceites esenciales se fue especializando, el arrastre con vapor ha sido reemplazado por tecnologías que funcionen a menor temperatura y pueda extraerse mayor cantidad de compuestos esenciales. (Granados et al, 2007).

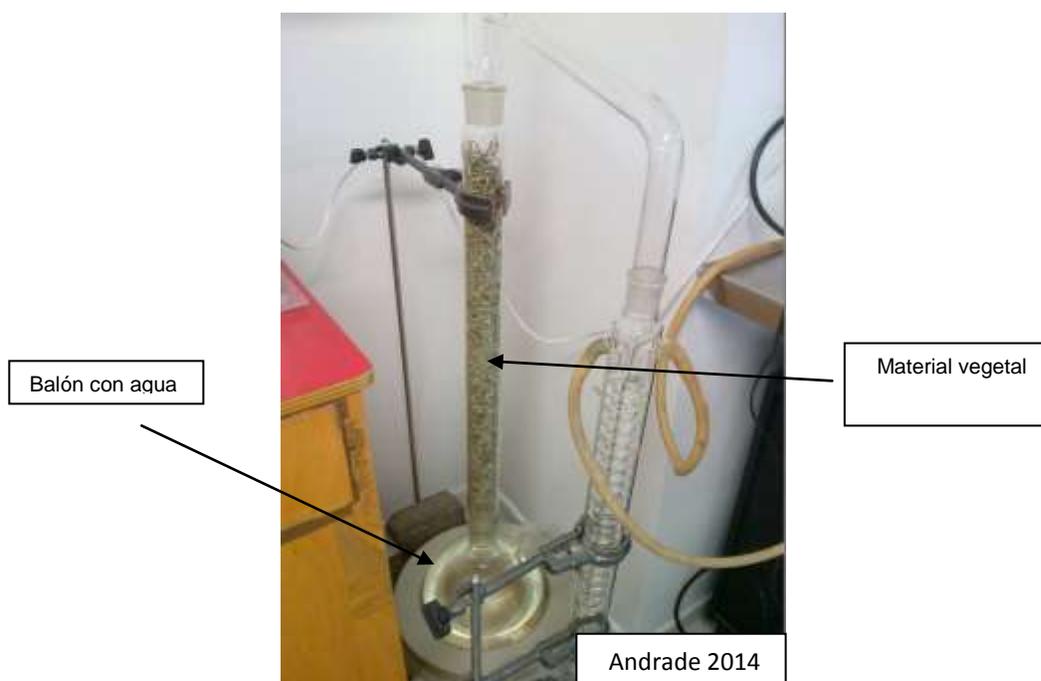


Fig. 6 Equipo de destilación por arrastre de vapor (AV)

2.2.2 Hidrodestilación (HD) en equipo Clevenger.

El equipo Clevenger es el más adecuado para la determinación del contenido total del aceite esencial de una planta aromática (Cerpa. 2007; Rodriguez, et al 2012).

Para realizar la extracción en el laboratorio se tomaron aproximadamente 100 gramos de hoja (frescas), se agregó agua suficiente para tapan la muestra de material vegetal (aproximadamente 400 ml para hojas) y finalmente se calentó hasta

el punto de ebullición 92 ± 2 °C durante 4 h. Como producto del proceso de condensación se obtuvieron dos fases una de aceite esencial y otra de agua, obteniéndose finalmente una mezcla de aceite esencial, la cual se almaceno a 4°C protegida de la luz, para su concentración y posterior análisis (figura 7) .

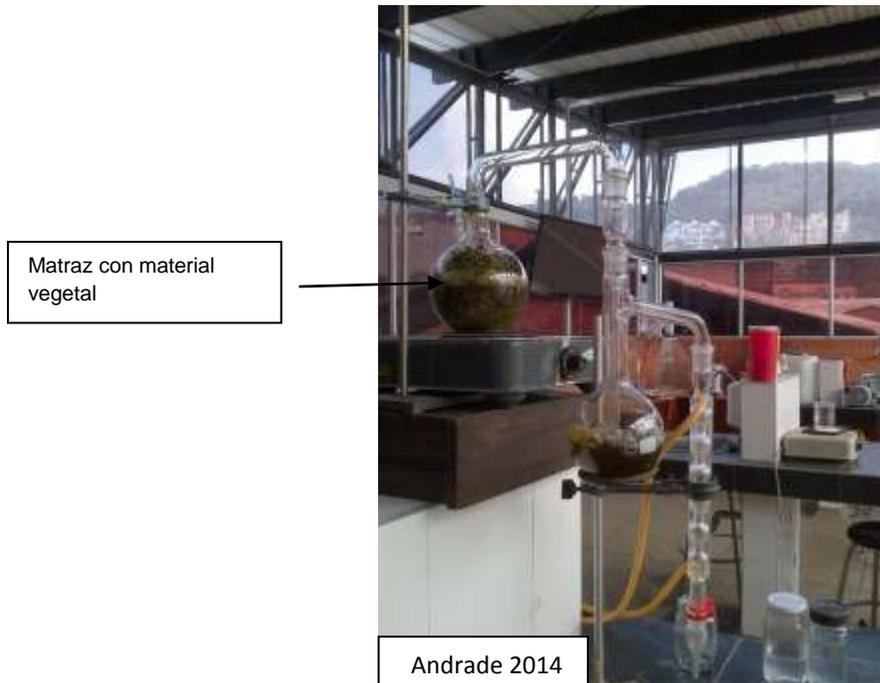


Fig. 7. Proceso de obtención del aceite esencial por HD. (Equipo clevenger).

2.2.3 Tratamiento de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales obtenidos por HD y ARRASTRE fueron concentrados en un rotaevaporador a 35 °C, a presión normal, se midió su volumen y peso, para obtener el porcentaje de rendimiento y la densidad absoluta de los mismos, luego se almacenaron en frío en recipientes donde no pudieran ser afectados por la luz, para su posterior identificación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría (CG-EM). (López 2008.)

2.3 Determinación del porcentaje (%) de rendimiento y densidad absoluta.

A los aceites esenciales obtenidos, de cada grupo de hojas según la planta, por cada método se le determinó el porcentaje de rendimiento.

2.3.1 Porcentaje de rendimiento.

El porcentaje de rendimiento en la obtención de aceites esenciales de las hojas de las tres plantas se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\%Rendimiento = \frac{\text{Peso del aceite (g)}}{\text{Peso de las hojas de la planta}} * 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

2.3.2 Densidad absoluta.

La densidad absoluta de los aceites esenciales se verificó determinando el peso de 100µL de cada extracto obtenido, en un matraz previamente seco y pesado, de acuerdo con la ecuación 2; la temperatura de trabajo fue de $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$. (ver tabla 6)

$$\text{Densidad absoluta} = \frac{\text{Masa del aceite (mg)}}{\text{Volumen del aceite (}\mu\text{l)}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

2.4 Identificación de los compuestos de los aceites esenciales.

La identificación de las sustancias presentes en los aceites esenciales obtenidos de las hojas de los tres tipos de asteráceas se realizó primero obteniendo los cromatogramas y espectros de masas, luego se compara con las librerías especializadas para este tipo de estudio y además se hace una comparación con el índice de Kovats para cada sustancia.

2.4.1 Identificación de sustancias presentes en los aceites esenciales obtenidos de hojas de *C bonariensis*, *G pellitum* y *A satureioides*.

La muestra de análisis se preparó tomando una alícuota de 50 μL del aceite esencial obtenido, se le agregó 1,0 μL de patrón interno (*n*-tetradecano), y se completó a 1 mL con diclorometano.

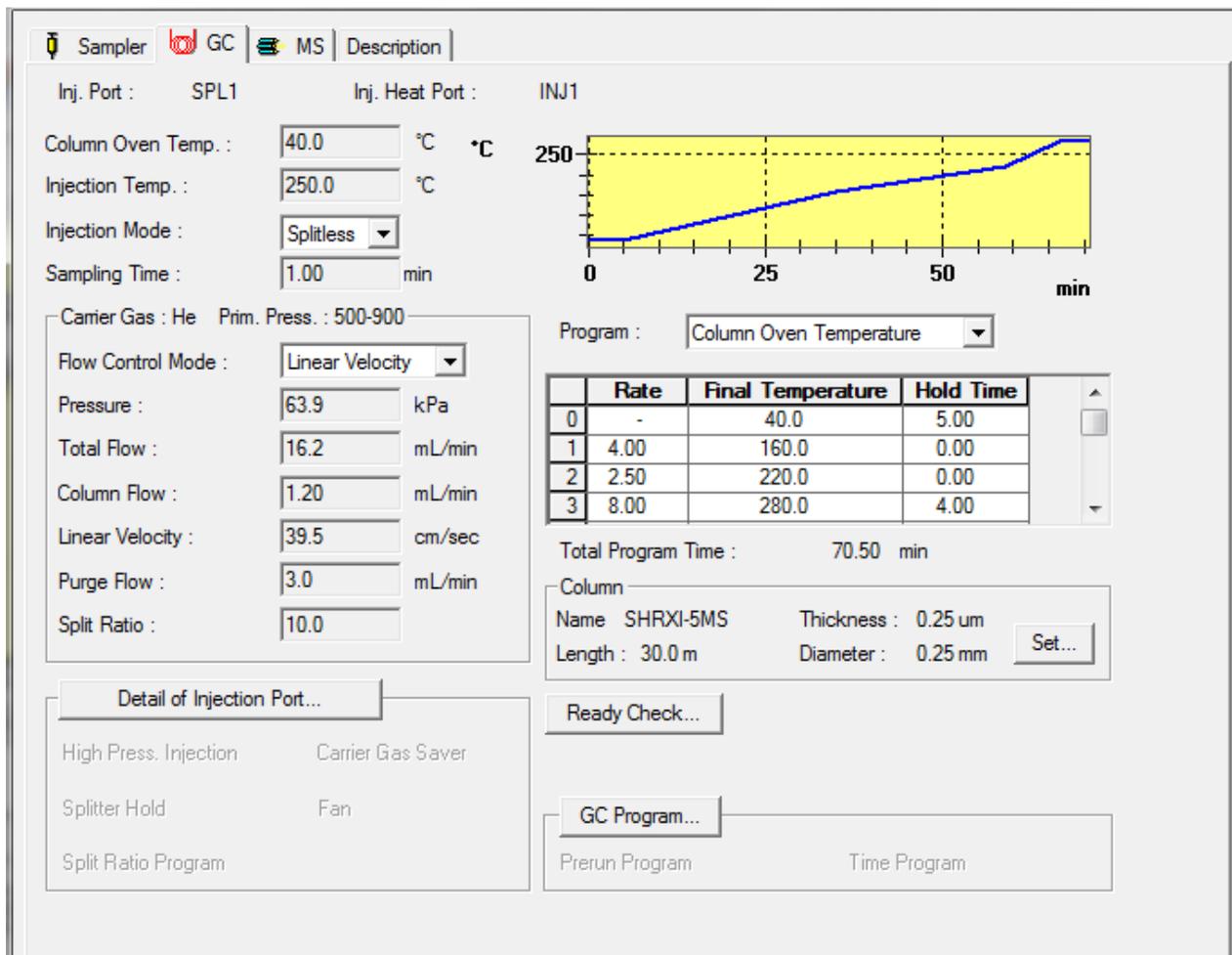
Posteriormente, se inyectó 1 μL de cada una de las soluciones al equipo CG-EM, para su análisis cromatográfico. La identificación cromatográfica de los componentes del aceite esencial de hojas extraído por las técnicas de hidrodestilación (HD) y arrastre por vapor (AV), se realizó por medio de comparación de los espectros de masas obtenidos con los de las librerías NIST 8,0 y WILEY 8.0, teniendo en cuenta el porcentaje de coincidencia. (ver Figuras 7 al 12 y anexo I).

Columna . El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Shimadzu QP-2010 plus, acoplado a un detector selectivo de masas Technologies MS 5975B (70 Ev), equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación de *split* 10:1) y un inyector automático . Se utilizó una columna capilar de sílice fundida, SHXRi 5mm (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) de 30 m x 0,25 mm (d.i.) x 0,25 μm (df), con fase estacionaria 5% fenilpolimetilsiloxano.

La programación de la temperatura fue: de 40 °C (5 min) @ 5 °C/min, hasta 60 °C (1 min) @ 30 °C/min, hasta 160°C (0 min) @ 4 °C/min, hasta 220°C (2,5 min) @ 40 °C/min, hasta 280°C (4 min). Las temperaturas de la cámara de ionización y la línea de transferencia se mantuvieron a 230 y 325°C, respectivamente. Los espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) fueron adquiridos en un cuádruplo, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), a 4,75 *scan* s⁻¹, en el rango de masas *m/z* 40-400. Adicionalmente, los espectros de masas de cada componente fueron analizados por la base de datos *MSD Chemstation* G1701DAD.03.00611, comparando con las librerías NIST 8,0 y WILEY 8.0.

2.4.1.1. Cuantificación de los componentes identificados.

Los metabolitos secundarios identificados en los Aceites esenciales, de las hojas de *Conyza bonariensis*, *Gnaphalium pellitum* y *Achyrocline satureioides*, se cuantificaron aplicando el método de estandarización interna; para ello se empleó *n*-tetradecano (Merck), como estándar interno, este fue adicionado en la etapa previa de preparación de las muestras para análisis cromatográfico.



2.5 Determinación de actividades biológicas.

A los aceites esenciales obtenidos se les determinó la actividad antioxidante y antibacteriana.

2.5.1 Actividad antioxidante.

Dada la importancia de la búsqueda y la medida de antioxidantes, se han generado una serie de técnicas para la medida de los mismos, entre la más usadas están las espectrofotométricas, que se basan en la medida de la reacción con radicales libres

estables, tales como DPPH[•] (1,1-difenil-2picrilhidra-zil), siendo la medida de la disminución de la absorbancia del catión radica DPPH[•] una de las más utilizadas.

Las pruebas de actividad antioxidante se realizaron según el método propuesto por Eugenio José García, empleando la capacidad antioxidante del DPPH[•] y su habilidad de secuestrar radicales de larga vida. (Garcia, et al 2012).

2.5.1.1 Radicales.

Un radical libre, por definición, es una molécula o simplemente un átomo con un electrón no apareado, convencionalmente simbolizado por un punto "*" sobre la molécula o átomo. Un ejemplo desde el punto de vista del tamaño molecular, el radical del DNA (sobre el carbono 4', en el azúcar) y un átomo de bromo.

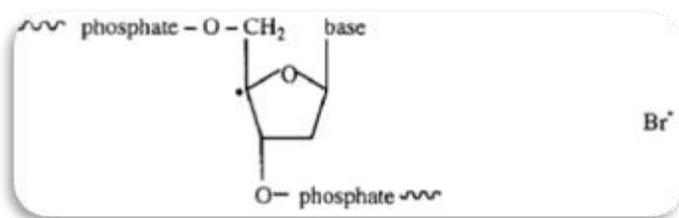


Fig 8 Radical DPPH[•]

El ADN y el bromo son especies de interés en determinados procesos biológicos. El radical del ADN se genera, por ejemplo, por reacción de un radical OH^{*} con esta macromolécula fundamental en cualquier sistema de celulares expuestos a la radiación ionizante y es un precursor potencial directo de una lesión lineal de las células, y el átomo de bromo, por el contrario, se forma en el proceso de la degradación de la reducción de 1,2-dibromoetano, una toxina conocida.

Las formas en las que actúa un radical en un sistema biológico, son por medio de los procesos oxidativos, cabe señalar que la oxidación de moléculas biológicas no siempre es un proceso dañino. Hay algunas funciones fisiológicas, que dependen de la formación de productos oxidados, por ejemplo los resultados de la oxidación lipídica enzimática en la formación de prostaglandinas biológicamente activas y otros compuestos biológicamente activos, etc. Sin embargo, "el cóctel de radicales libres" puede ser una causa de potentes eventos dañinos, y por lo tanto, el organismo tiene que desarrollar potentes sistemas de protección anti-radical. Tradicionalmente, estos sistemas se denominan sistemas antioxidantes. (Zentella et al 1996).

Los radicales libres juegan un importante rol en muchos procesos biológicos incluyendo secuencia de reacciones metabólicas, señales celulares, respuesta inmune y variedad de condiciones patológicas y fisiológicas. Los radicales libres son generados en medio biológicos como un resultado de reacciones asociadas con reacciones biológicas, que involucran oxígeno en el metabolismo. (Vargas, et al 2007).

2.5.1.2 Detección de radicales libres por tiempo.

Los radicales libres son altamente reactivos e inestables comparados con su similar ion. La presencia de los electrones no apareados tiene una consecuencia sobre su reactividad en general es muy alta de tal especie. Esto, por supuesto, refleja el deseo genuino de la especie “radical” para alcanzar el estado energético más favorable mediante el acoplamiento de su espín desapareado formando un nuevo enlace entre dos átomos de spin. En consecuencia, muchas de las reacciones que se encadenan, ocurren tan pronto como las dos especies que reaccionan, se interrelacionan entre si. (Millones 2009)

La detección y cuantificación de estas especies es crítica para descifrar la secuencia de reacciones celulares y entender los mecanismos de la enfermedad y su función. Las reacciones de radicales libres son generalmente muy rápidas y por lo tanto, escapan a cualquier detección directa en un proceso in vivo en tiempo real, en un experimento. Afortunadamente las constantes de velocidad absoluta es una propiedad inherente de cualquier sistema reactivo particular, por lo tanto en modelos in vitro se podrá determinar el recipiente “biológico” adecuado y la forma adecuada de identificar su presencia en este recipiente, lo que falta es saber la forma en la que ocurren e intervienen los radicales libres en los procesos biológicos. (Zentella et al. 1996).

Desde el punto de vista científico, la reacción de un radical, a través de un proceso de difusión controlada, con sustratos que se encuentran presentes en una concentración, la reacción se presenta en un periodo de tiempo de milisegundos, por lo tanto cualquier técnica para el estudio directo de las reacciones rápidas, en consecuencia debe haber un sistema de detección rápida, para el análisis de la cinética del radical (solo entonces se permite ver cómo actúa el radical), una característica que debe poseer el radical para ser estudiado, es que debe poseer una característica perceptible, de hecho, la mayoría de los radicales son de color, no necesariamente en la parte visible del espectro, pero las regiones del IR y UV son igualmente accesibles por los modernos estudios de tiempo para resolver la espectroscopia óptica. En principio, como cualquier otra propiedad

detectable con una resolución de tiempo apropiado es adecuado (Baxendale J. et al. 1982).

2.5.2 Antioxidantes.

Un antioxidante es cualquier sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones en comparación con las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de este sustrato. La definición anterior no incluye todas las posibilidades de los mecanismos de acción antioxidante, pero tiene la virtud de poner de relieve la importancia del objetivo elegido para el estudio y el origen de las especies reactivas empleadas para caracterizar un antioxidante. (Calderón, et al 2012)

2.5.2.1 Sistemas Antioxidantes.

Los sistemas antioxidantes, son usados en el sistema fisiológico como protección de radicales, donde se encuentran numerosos compuestos de diversas estructuras, como enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa, etc.), antioxidantes endógenos de bajo peso molecular (glutación, ácido úrico, etc.), antioxidantes exógenos. (Avello, M, 2006)

2.5.2.2 Clasificación de los antioxidantes.

La oxidación de compuestos orgánicos se originan por un mecanismo similar, por medio de alternar las reacciones de los radicales alquilo y peroxilo. La oxidación de un compuesto orgánico puede ser retardada por una de las siguientes maneras. Romper las cadenas reproducida por la reacción con radicales peroxilo aceptor. (Romero et al 1987.)

1. Romper las cadenas por la reacción de aceptor con los radicales alquilo.
2. Si el radical hidroperóxido es el principal auto-iniciador, la oxidación puede ser retardada por la introducción de compuestos químicos capaces de descomponer hidroperóxido sin formar radicales libres.

Inhibidores poli-funcionales pueden ejercer una acción combinada, al participar en diferentes reacciones inhibitorias. La mezcla de antioxidantes puede actuar de manera similar.

Con respecto al mecanismo de acción, los antioxidantes se pueden dividir en los siguientes siete grupos. (Padilla, et al 2008).

Tabla 4. Mecanismos de acción de algunos antioxidantes.

Tipo de antioxidante	Mecanismo de acción	Ejemplo de antioxidante
Los antioxidantes que rompen las cadenas por reacción con radicales peroxilo	Estos son compuestos reductores con enlaces O-H y enlaces N-H débiles, que reaccionan fácilmente con los radicales peroxilo para la formación de radicales intermedios de baja actividad.	Fenoles Naftoles Hidroquinonas Aminofenoles Diaminas
Los antioxidantes que rompen las cadenas por reacción con radicales alquilo.	Estos son compuestos, que aceptan fácilmente los radicales alquilo. Estos antioxidantes son eficaces en concentraciones muy bajas de di-oxígeno y en polímeros sólidos.	Quinonas Nitronas Radicales estables nitroxilo y nitrocompuestos. carotenoides
Antioxidantes que descomponen hidroperóxido.	Estos son compuestos que reaccionan con hidroperóxidos sin la formación de radicales libres.	Sulfuros Fosfitos Carbamatos Algunos complejos de metales Proteínas Aminoácidos
Antioxidantes que desactivan metales.	Ligando compuestos metálicos a compuestos inactivos	Óxidos de hidroperóxidos Diaminas Hidroxiácidos.
Cadena cíclica, terminación por los antioxidantes.	En otras palabras, la terminación de la cadena se produce como un proceso cíclico catalítico (los antioxidantes se regeneran en las reacciones de terminación de la cadena). La terminación de la cadena múltiple puede tener lugar, por ejemplo, en los polímeros.	aminas aromáticas, los radicales nitroxilo, y compuestos que poseen metales de valencia variable
Los inhibidores de la acción combinada.	Algunos antioxidantes pueden interactuar con los radicales R* y RO ₂ *. Sin embargo, una molécula de inhibidor puede tener dos o más grupos funcionales, cada uno de los que puede someterse a su propia reacción.	Antraceno Metilenequinona Carbonatos Tiofosfatos
Sinergismo de varios antioxidantes.	Cuando dos inhibidores mutuamente mejoran sus efectos inhibitorios, es una acción sinérgica.	Ácido cítrico Ácido ascórbico

2.5.3 Solventes y reactivos

Todos los solventes fueron grado reactivo de Merck, los compuestos patrón fueron adquiridos de Sigma-Aldrich y Acros organic, tales como:

Tabla 5. Solventes y reactivo.

Solventes y reactivos	Uso
Metanol	Ejecución de métodos de actividad antioxidante
2,2-difenil- 1-picrilhidracilo (DPPH [•]).	Ejecución de métodos de actividad antioxidante



Fig. 9. Reactivo DPPH[•].

Aparatos y equipos empleados

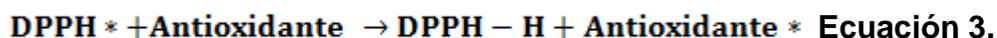
- Viales de 3.0mL.
- Tubos cónicos de polipropileno de 1.5 mL
- Cubetas de plástico 10 x 10 x 45 mm semi-micro PMMA
- Pipetas volumétricas y aforadas de 1.0 y 5.0
- Balones aforados de 100, 25.0 y 10.0 mL
- Vasos de precipitados de 50, y 100 (Schott Duran, Alemania).
- Baño ultrasonido con calentamiento (E 15H. Elmasonic.)
- Balanza analítica Adventurer OHAUS ± 0.1mg.
- Espectrofotometro Espectronic 21 D perkin elmer UV/vis.

2.5.4 Métodos de actividad antioxidante que combina transferencia de un solo electrón y transferencia de un átomo de hidrogeno (ET-HAT).

Los ensayos que combinan el método ET-HAT, son métodos que se creen que actúa por el método HAT (transferencia de un átomo de hidrógeno) o por el método ET (transferencia de un solo electrón), pero estudios reciente sugiere lo contrario. Debido a la reactividad y lo complejo de los mecanismos, son difíciles de interpretar sin información detallada sobre la composición y las estructuras de los antioxidantes en prueba. La interpretación se dificulta cuando se trata de pequeñas moléculas que actúan como agentes reductores, p.ej. el ácido ascórbico que está presente en los extractos fenólicos (Ugartondo C, V 2009).

2.5.5 Actividad de barrido de radicales libres – DPPH[•].

Este método, fue desarrollado por Brand-Willams 1995-1996. El DPPH[•] (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) donde la capacidad antioxidante se basa en la disminución de color, medida a 517nm, por acción de un compuesto antioxidante (ecuación 3).



Igualmente, dicha actividad puede ser medida por resonancia espín-electrón, (Prior, et al. 2005). El radical DPPH[•] es un radical nitrogenado orgánico y estable, posee un intenso color púrpura y se encuentra en forma de radical, no necesita generación previa (Fig 10)

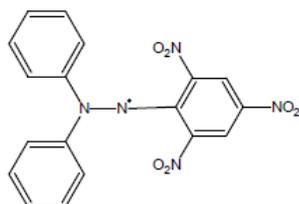


Fig 10 Estructura del radical DPPH[•].

La capacidad antioxidante se calcula como el porcentaje de captación DPPH[•], según la fórmula de Yen and Duh (1994) (ecuación 4):

$$\% \text{ de captación DPPH} = \frac{A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}}{A_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde A_{inicial} es la absorbancia de control a tiempo 0 min y A_{final} es la absorbancia del antioxidante a tiempo 10 min. El % de captación DPPH[•] es proporcional a la concentración de antioxidantes, y la concentración que provoca una disminución en la concentración inicial de DPPH[•]. Muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con los radicales peroxilo pueden reaccionar con lentitud o incluso puede ser inerte al DPPH[•] debido al impedimento estérico.

La metodología desarrollada fue la siguiente:

1- Preparación de soluciones:

2- Preparación del radical DPPH[•]: Se disolvieron 2 mg de DPPH[•] Sigma-Aldrich, en 100 ml de metanol, la solución se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad. Posteriormente fueron preparadas soluciones de trabajo hasta obtener una absorbancia de 0.700 ± 0.050 para todos los casos (Villano, D. *et al.* 2007), a una longitud de onda de 517nm.

2- Preparación de la curva de calibración: A 900 μL del radical DPPH[•] se le adicionaron 300 μL de cada una de las diluciones de la medición se realizó a 517 nm, y el porcentaje de inhibición se calculó con base en la siguiente ecuación (5)

$$\% \text{ de Captación} = \%C = \frac{A - A_1}{A} * 100 \quad (\text{Ecuación 5})$$

A= Absorbancia inicial.

A_1 = Absorbancia final de la muestra.

El porcentaje de captación representa la pérdida del poder antioxidante del DPPH[•], cuando le es agregado un compuesto antioxidante, disminuyendo así la absorbancia de la solución, que es medida a 517 nm; la absorbancia inicial se toma en el minuto cero sin adición de la solución problema, la absorbancia final se toma 10 minutos después de agregar el aceite esencial o solución problema.

Método DPPH

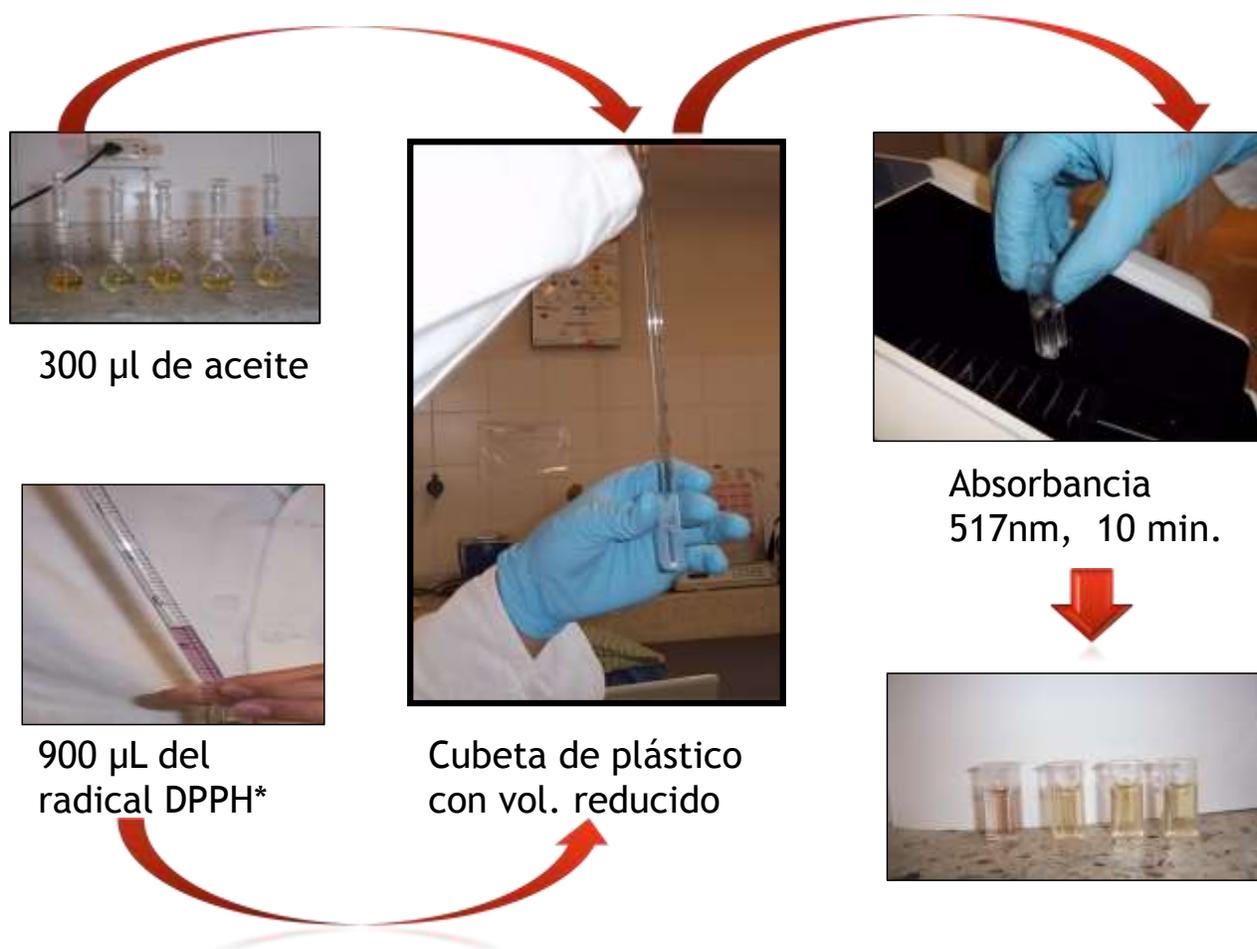


Fig 11 Diagrama del método DPPH[•]

- 3- Medición de la actividad antioxidante de los aceites esenciales: En una celda de plástico de volumen reducido en la cual se agregó 900 μ L del radical DPPH[•], se midió la absorbancia a 517 nm, luego se adicionaron 300 μ L de la dilución del extracto de aceite esencial y nuevamente se midió la absorbancia a la misma longitud de onda durante 10 minutos, cada 30 seg. Para realizar la evaluación de la actividad antioxidante de cada uno de los aceites

esenciales, se preparó una dilución de 1000 ppm y después se realizaron diluciones consecutivas hasta llevarlas a concentraciones finales de 250, 125, 25 y 2,5 ppm. A cada una de estas diluciones se le evaluó la capacidad antioxidante.

4- Determinación de AAR (Relative Antioxidant Activities)

La actividad antioxidante relativa frente al catión radical DPPH[•]; fue calculada de acuerdo a (Kartal et al. 2007) mediante la ecuación 6; la AAR equivale a decir la concentración en mM/Kg, con una capacidad antioxidante equivalente a la de una concentración 1 mM/Kg de la sustancia problema (Guerrero A, 2000)

$$AAR = 100 * IC_{50} \text{ Muestra} / IC_{50} \text{ Control} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Se determina interpolando sobre la curva de calibración, tomando como base la inhibición lograda por la muestra problema.

mg/L: Concentración de la muestra problema expresada en estos términos (ppm).

2.6 Actividad antibacteriana.

Se realizaron antibiogramas utilizando la técnica de perforación en placa (Vásquez, M et al 2014) y se midió la capacidad antibacteriana de los extractos a concentraciones de 1 mg (20 mg/ml), 2 mg (40 mg/ml), 3 mg (60mg/ml) y 5 mg (100 mg/ml), basándose en estudios previos realizados sobre (Pino. N., Martínez. L., Stashenko, E.; 2008); el ensayo se llevó a cabo en el laboratorio de Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana (Edificio Carlos Ortiz laboratorio 103), las cepas bacterianas fueron del tipo ATCC (*American Type Culture Collection*), entre las bacterias gram positivas se seleccionaron: *Staphylococcus aureus* ATCC 6535 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984; mientras que para las bacterias gram negativas se eligieron: *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027 y *Proteus mirabilis* ATCC 29906, a estas bacterias se les sembró controles positivos que contenían Rifaximina y como control negativo se empleó DMSO.

La metodología empleada para la determinación de la actividad antibacteriana se describe a continuación:

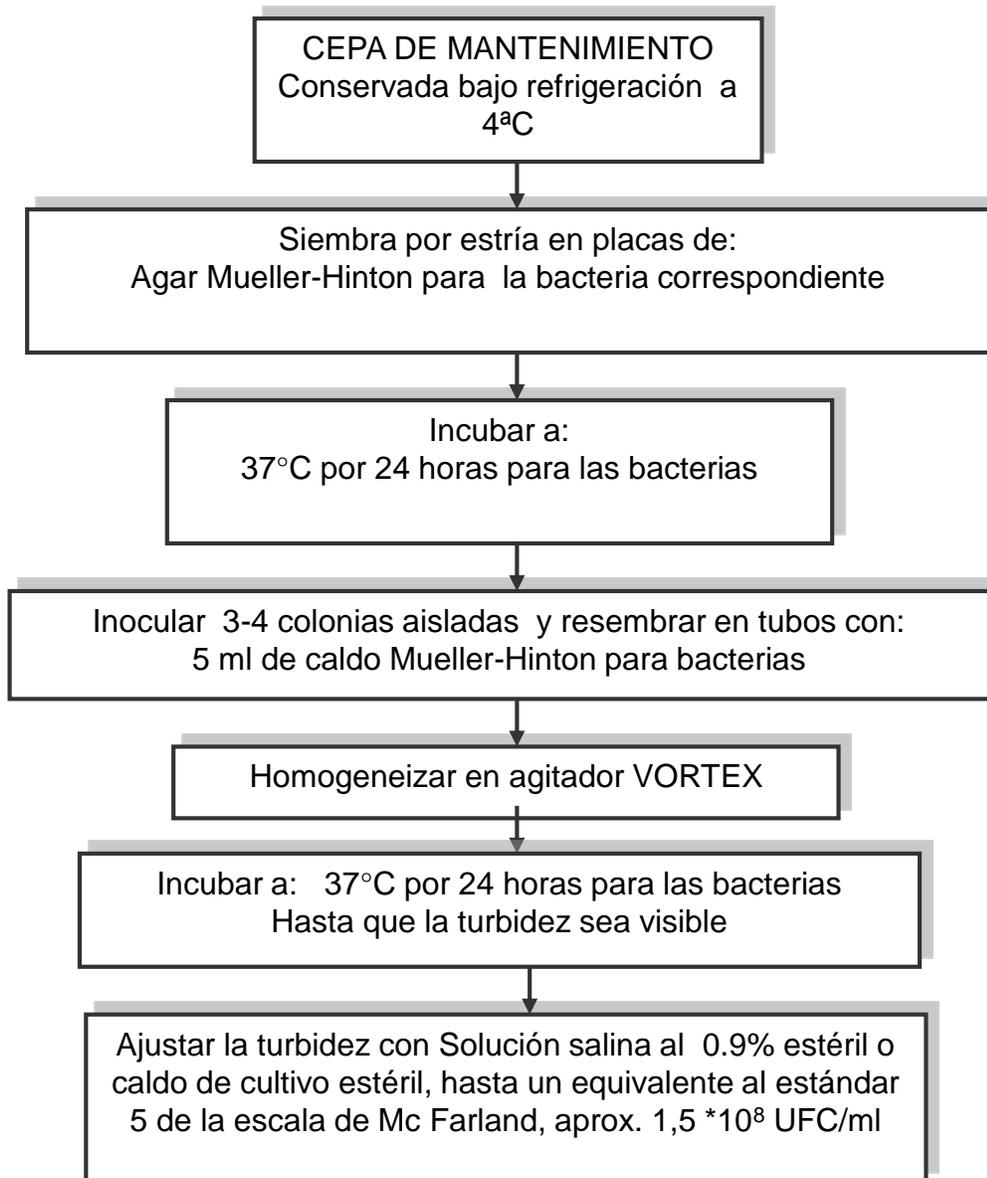


Fig 12 Proceso Preparación Medios.

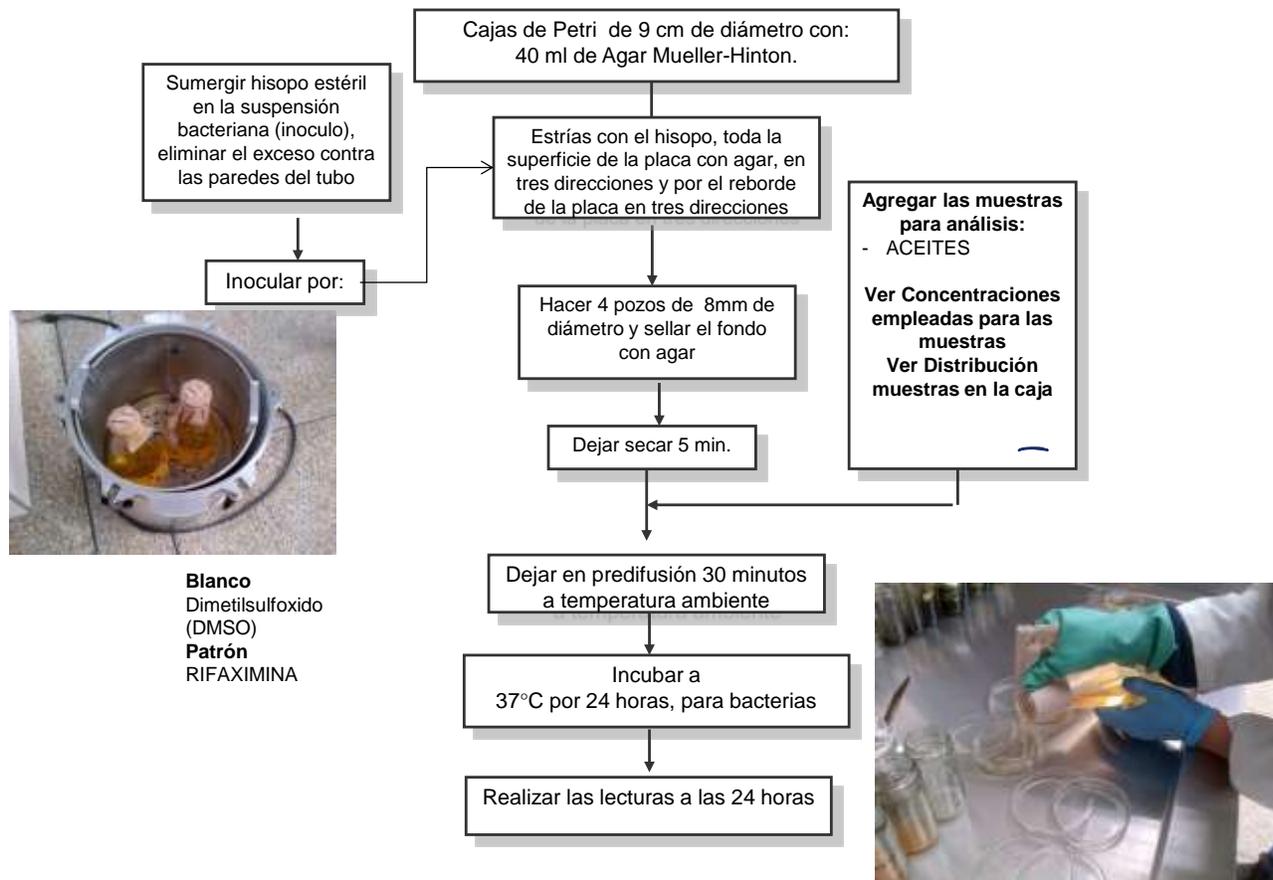


Fig 13 Preparación medios de cultivo.

2.6.1 Preparación de las cepas bacterianas:

1. La preparación de las cepas. Esta fue realizada en el laboratorio de microbiología de la Universidad El bosque, se tomaron de 3 a 5 colonias de una misma bacteria tipo ATCC con un asa metálica y se transfirieron a un tubo con 5 ml de caldo soya tripticasa, hasta alcanzar una turbidez 0,5 Mc Farland luego se incubo a 37°C, esta concentración se logra entre 4 y 6 horas después del inicio del cultivo.
2. Preparación del medio de cultivo: Para este se empleó 25 ml agar Mueller Hinton de acuerdo con las especificaciones del fabricante preparado en cajas de petri de 9

cm de diámetro y 0,6 cm de espesor

2. Siembra de bacterias: luego de alcanzar la concentración adecuada se realizó una siembra masiva en la superficie de las cajas de petri con 0.1 ml de inóculo tomado del tubo que se encuentra a la turbidez de la escala 5 de Mc Farland con cada una de las bacterias, con un asa se distribuyó uniformemente por la superficie del medio de cultivo, luego se dejó reposar por 10 minutos.
3. Elaboración de pozos: para cada caja de Petri se estableció una cantidad de cuatro pozos equidistantes de 8 mm de diámetro, estos se elaboraron con ayuda de una pipeta.
4. Siembra de muestra: a cada uno de los pozos se le adiciono 20 μ l de agar Muller Hinton preparado de acuerdo a las instrucciones del fabricante; se dejó reposar y posteriormente se le agrego a cada pozo 50 μ L de solución muestra/solvente, con diferentes concentraciones, se sometió a incubación a 37°C por un periodo de 24 horas. Después de transcurrido este tiempo se procedió a medir los respectivos halos de inhibición.
5. Concentración crítica (C.C.) La observación de la respuesta antimicrobiana en estas concentraciones, permite determinar si existe una correlación entre la concentración de extracto y la acción antimicrobiana. Una vez realizadas las lecturas de halos de inhibición se graficó el logaritmo natural de las concentraciones de extractos y fracciones empleadas contra el cuadrado de los diámetros de inhibición (X^2); de esta forma se obtiene una recta que se ajusta por mínimos cuadrados y por extrapolación se halla el punto de intersección sobre la ordenada que corresponde al valor del Ln de la concentración crítica (C.C.). La concentración crítica se define como la concentración de sustancia antimicrobial que se difunde en la superficie del agar o gel, en la interface entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas; representa una medida de la susceptibilidad de un microorganismo, este valor se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida en pruebas de dilución (Koneman 1999).

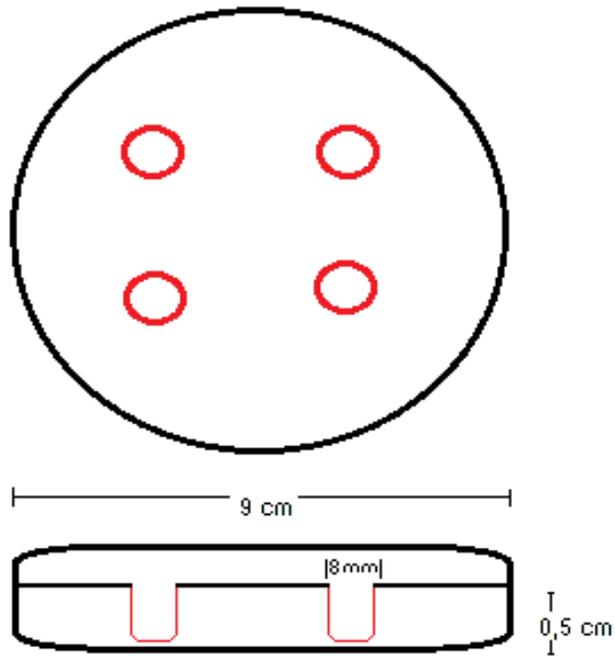


Fig 14 Distribución de los pozos en cajas de Petri.

Protocolo de siembra



$mg = V \times C$. Ej. $\mu g = 100\mu g/\mu L \times 50\mu L = 5000\mu g = 5mg$

Aplicar 10µL, 20µL, 30µL, 50µL en cada pozo, completando a volumen final de 50µL con DMSO, lo que corresponde a 1mg (20mg/ml), 2mg (40mg/ml), 3mg (60mg/ml), 5mg (100mg/ml) de **aceite**

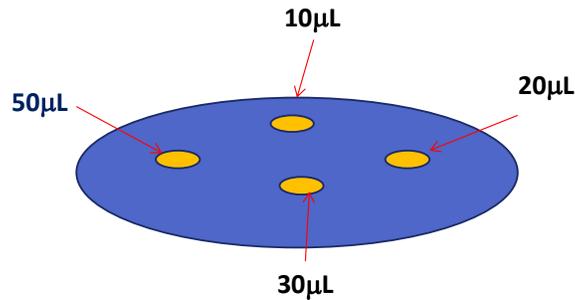
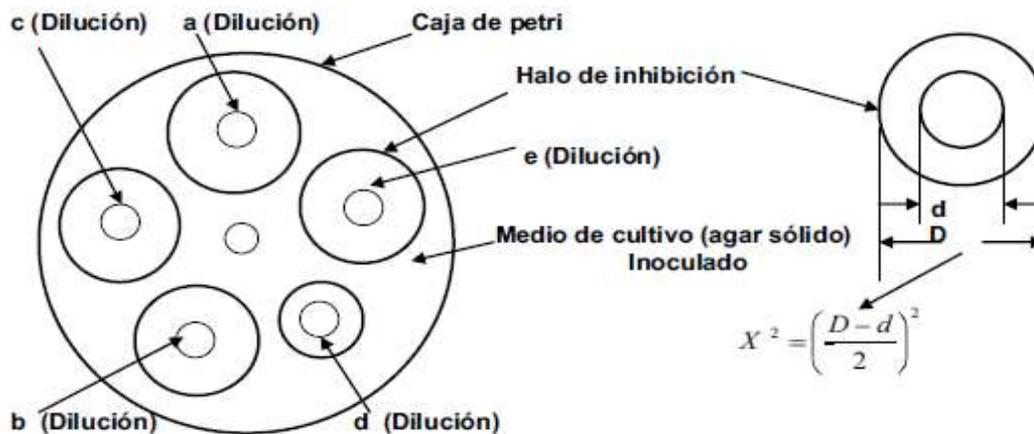


Fig 15. Protocolo de Siembra de extractos.



Donde: D = Longitud del diámetro del halo de inhibición.
 d = Longitud del diámetro del halo que contiene la dilución del antibiótico.

Fig 16 Esquema de los halos de inhibición formados por el método de difusión en gel.

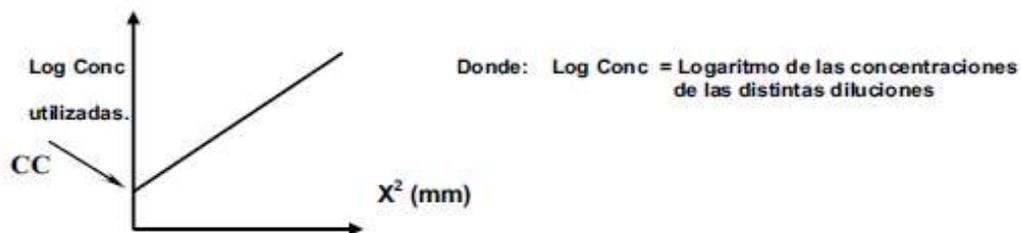


Fig 17 Gráfica log Concentración VS Longitud de la corona (X^2) Lorian (1996)

6. Se calculó el porcentaje de inhibición relativo de acuerdo a la ecuación 7.

$$\% \text{ de Inhibición relativa} = \frac{D \text{ halo extracto} - D \text{ halo control (-)}}{D \text{ halo control (+)} - D \text{ halo control (-)}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 7})$$

Dónde: Control Negativo (-): DMSO; control positivo (+): Rifaximina

3 RESULTADOS.

3.1 Obtención de los aceites.

Las especies obtenidas en la región cundiboyacense, al ser tratadas por dos diferentes métodos dan como resultado los aceites esenciales, presentados en la tabla 6.

Tabla 6. Relación peso material- peso aceite esencial y densidad

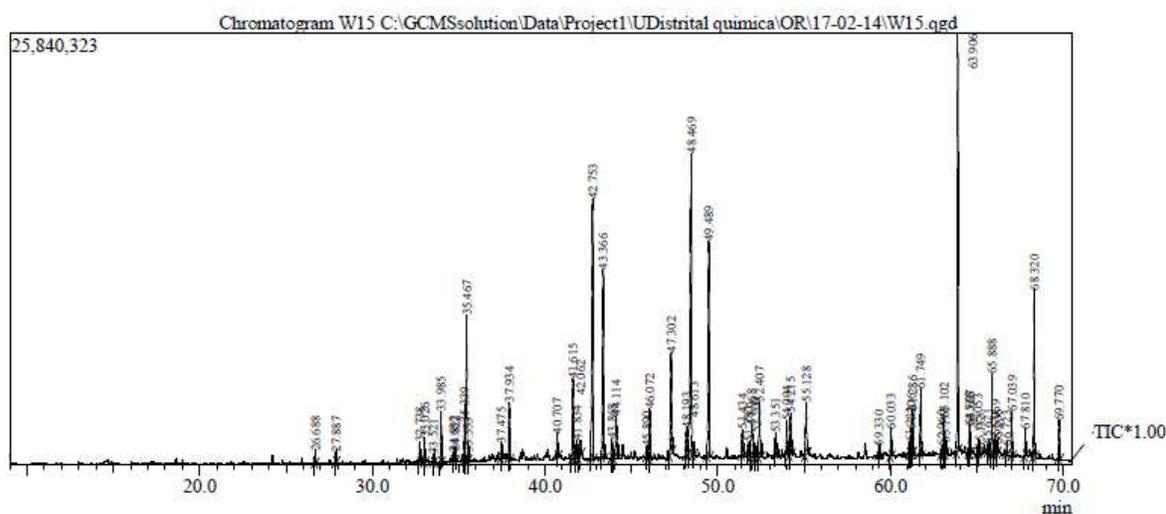
ESPECIE	Proceso	Peso Hojas(g)	Peso aceite (g)	Densidad mg/μL
<i>Conyza bonariensis</i>	HD	144,03	0,85	0.895
	AV	185,20	0,91	0.853
<i>Gnaphalium pellitum</i>	HD	167,33	0,76	0.928
	AV	200,31	0,78	0.787
<i>Achyrocline satureioides</i>	HD	195,34	0,86	0.813
	AV	185,25	0,64	0.765

AV= arrastre por vapor
HD= Hidrodestilación.

3.2 Análisis por Cromatografía de gases acoplado a masas.

Se presentan a continuación los cromatogramas de las especies estudiadas y algunos de los componentes de los aceites esenciales. Teniendo en cuenta el tiempo de retención y el área de los picos, la cual nos indica la concentración del componente presente en la muestra.

Fig 18. Cromatograma de *Conyza bonariensis*. (HD).



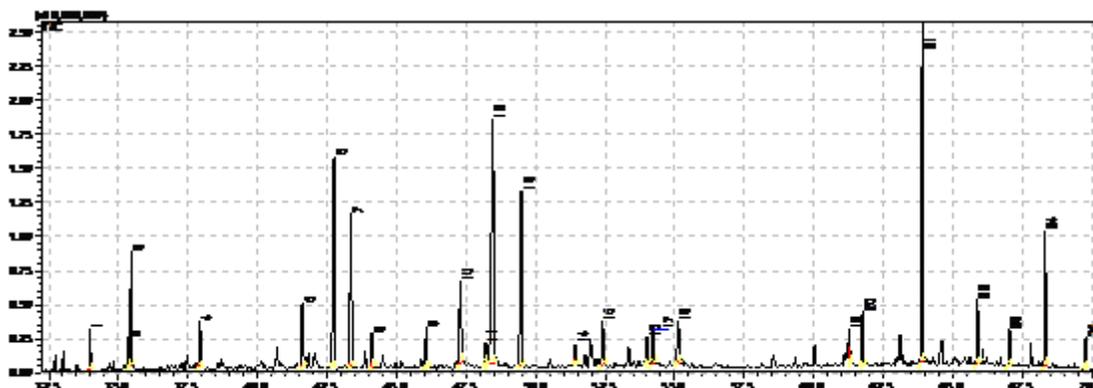


Tabla 7. Datos *C. bonariensis* HD. (Espectros de masas en el anexo 1 A)

t R= Tiempo de retención. I_K. T =Índice de kovacs teórico. I_K. E =Índice de kovacs experimental.

	t R.	% area	Nombre	I _K . T	I _K . E	Formula
2	35,339	0.99	1-Pentadeceno	1.489	1.501	C ₁₅ H ₃₀
5	41,615	3.23	1-Hexadecanol	1.883	1.847	C ₁₆ H ₃₄ O
6	42,753	10.52	Tetradecanoato de 2-propilo	1.823	1.791	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
7	43,366	7.24	6,10,14-trimetil- 2-Pentadecanona	1.848	1.854	C ₁₈ H ₃₆ O
9	46,072	1.71	Heptadecanoato de metilo	1.927	1.895	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
11	48,193	0.93	Hexadecanoato de etilo	1.975	1.967	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
12	48,469	16.00	Hexadecanoato de etilo	1.991	1.968	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
13	49,489	9.30	Hexadecanoato de metilo.	1.999	1.971	C ₁₉ H ₃₈ O ₂
14	51,434	0.96	E,E,Z-5,14-diol-1,3,12-Nonadecatrieno		1.972	C ₁₉ H ₃₄ O ₂
15	52,407	2.50	Fitol		2.055	C ₂₀ H ₄₀ O
16	54,004	1.09	Cis,Cis-9,12-Octadecadienoato de etilo	2.103	2.063	C ₂₀ H ₃₆ O ₂
17	54,215	1.62	Oleato de etilo	2.087	2.064	C ₂₀ H ₃₈ O ₂
18	55,128	2.12	Octadecanoato de etilo	2.168	2.099	C ₂₀ H ₄₀ O ₂
19	61,286	1.21	9,12,15-octadecatrienato de etilo	2.188	2.157	C ₂₀ H ₃₄ O ₂
20	61,749	2.14	Tunbergol		2.061	C ₂₀ H ₃₄ O
22	65,888	2.13	Heneicosano	2.100	2.138	C ₂₁ H ₄₄
23	67,039	1.49	Tetracosano	2.400	2.447	C ₂₄ H ₅₀
24	68,320	4.75	Hexacosano	2.600	2.632	C ₂₆ H ₅₄
25	69,770	1.12	Nonacosano	2.900	2.950	C ₂₉ H ₆₀

Fig 19. Cromatograma de *Conyza bonariensis* (AV)

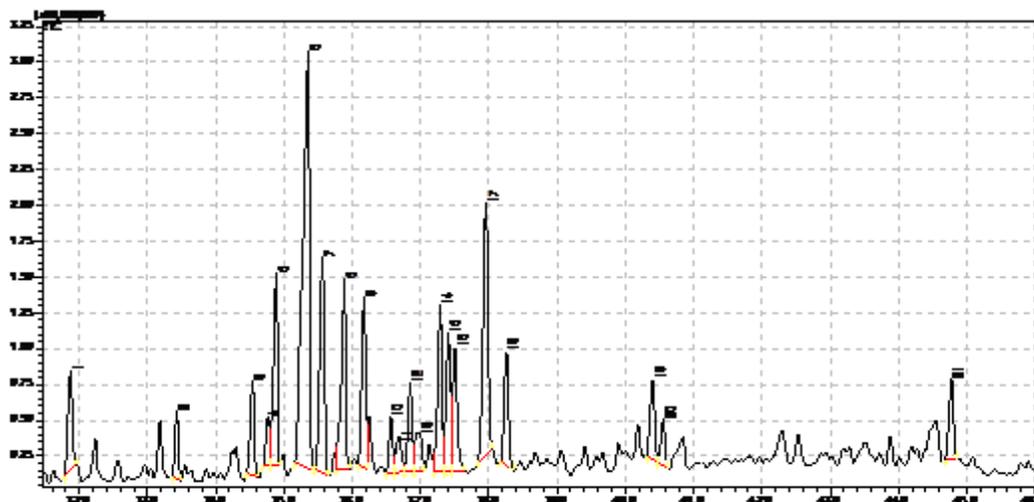
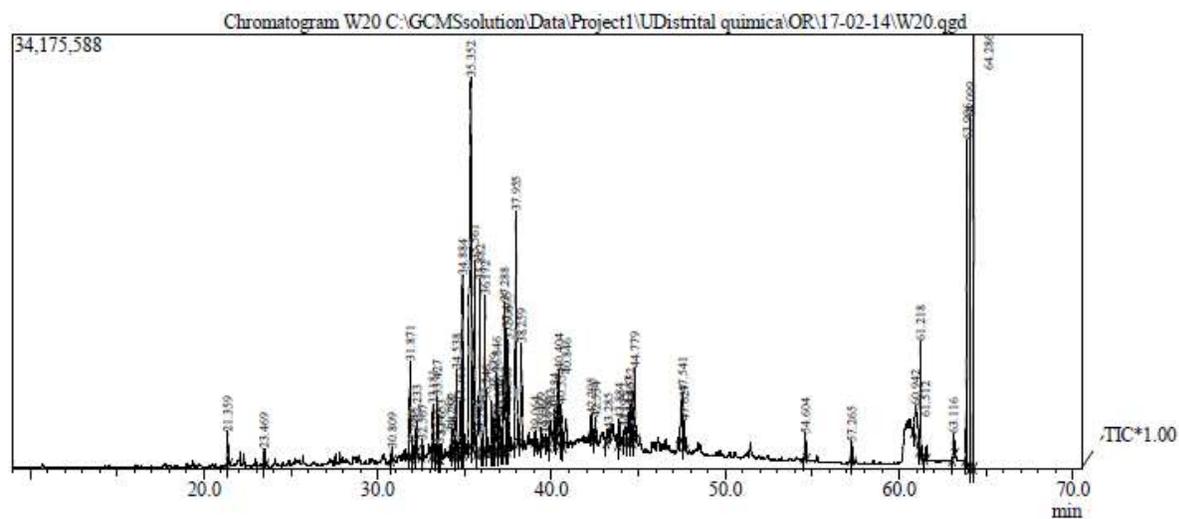


Tabla 8 Datos *C bonariensis* AV. (Espectros de masas en el anexo 1 B)

	t R.	% area	Nombre	I _K . T	I _K . E	Formula
1	31,871	2.96	1-Dodecanol	1.469	1.439	C ₁₂ H ₂₆ O
2	33,427	1.59	Widdrol	1.651	1.596	C ₁₅ H ₂₆ O
3	34,538	2.51	Epiglobulol	1.580	1.562	C ₁₅ H ₂₆ O
4	34,753	1.40	Ledol	1.582	1.563	C ₁₅ H ₂₆ O
5	34,884	5.15	Cariofilenil alcohol	1.568	1.564	C ₁₅ H ₂₆ O
6	35,352	18.50	(-)-Globulol	1.580	1.566	C ₁₅ H ₂₆ O
7	35,561	6.75	Epiglobulol	1.582	1.567	C ₁₅ H ₂₆ O
8	35,882	5.44	Viridiflorol	1.585	1.569	C ₁₅ H ₂₆ O
9	36,172	4.78	Caryophyllene epoxid	1.613	1.570	C ₁₅ H ₂₄ O
10	36,565	1.39	Cubenol	1.642	1.593	C ₁₅ H ₂₆ O
11	36,700	1.26	Humulane-1,6-dien-3-ol	1.619	1.603	C ₁₅ H ₂₆ O

12	36,846	2.50	Tetracyclo[6.3.2.0(2,5).0(1,8)]tridecan-9-ol, 4,4-dimethyl-	-	1.574	C ₁₅ H ₂₄ O
13	37,000	1.78	alpha.-Cadinol	1.650	1.595	C ₁₅ H ₂₆ O
14	37,290	4.70	beta.-Selinenol	1.651	1.626	C ₁₅ H ₂₄ O
15	37,405	4.17	tau.-Muurolol	1.648	1.677	C ₁₅ H ₂₆ O
16	37,506	3.76	trans-Longipinocarveol,	-	1.677	C ₁₆ H ₂₄ O
17	37,955	8.19	7-Hexadecenal, (Z)	1.798	1.780	C ₁₆ H ₃₀ O
18	38,259	3.34	11-Hexadecyn-1-ol	1.863	1.881	C ₁₆ H ₃₀ O
19	40,404	2.45	metanoato , 3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ilo	1.752	1.703	C ₁₆ H ₂₆ O ₂
20	40,554	1.28	(1S,2E,4S,5R,7E,11E)-Cembra-2,7,11-trien-4,5-diol	-	2.058	C ₂₀ H ₃₄ O ₂
22	61,218	2.42	Diisooctyl adipate	-	2.256	C ₂₂ H ₄₂ O ₄

Fig 20. Cromatograma de *Gnaphalium pellitum*.(HD).

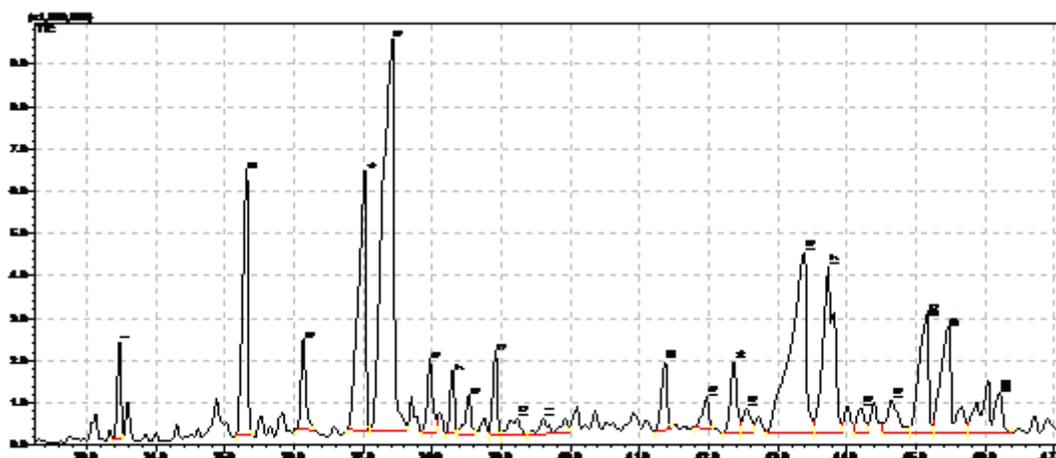
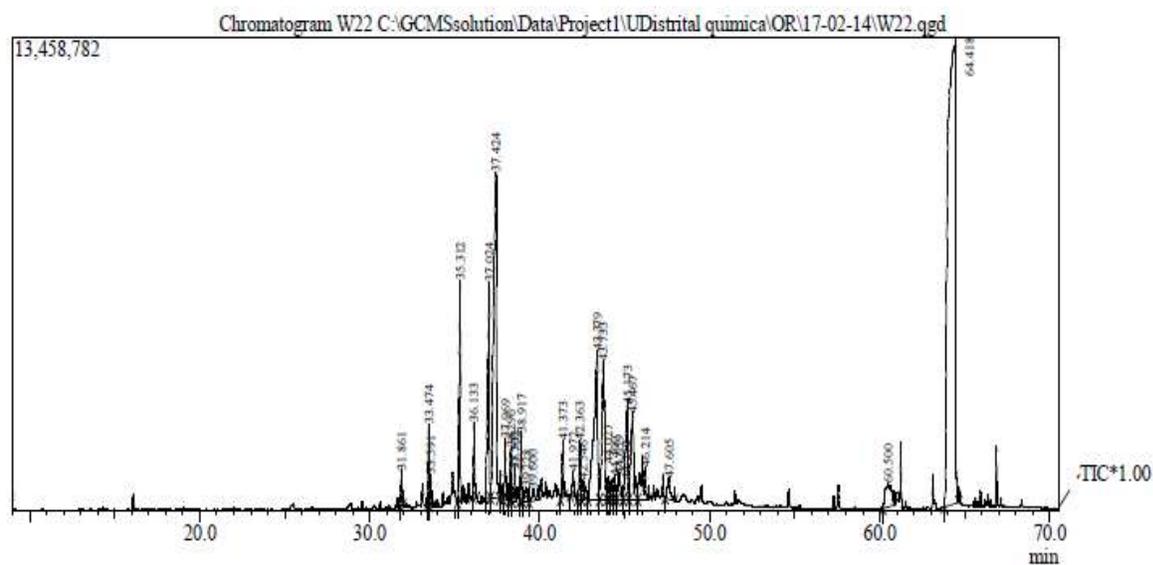
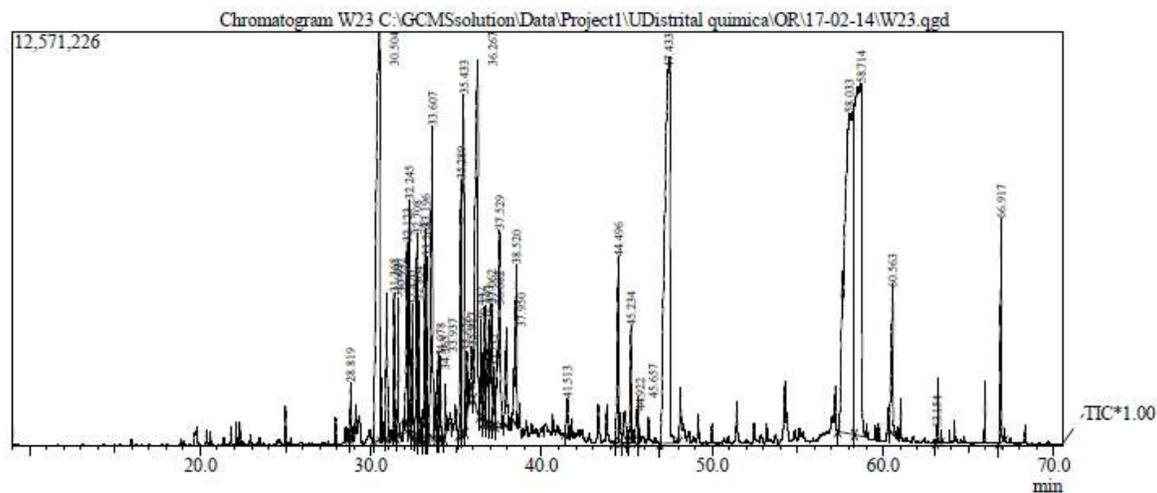


Tabla 9 Datos de *G pellitum.HD.* (Espectros de masas en el anexo 1 C)

	t R..	% area	Nombre	I _K . T	I _K . E	Formula
1	33,474	0.95	Widdrol	1.592	1.556	C ₁₅ H ₂₆ O
2	35,312	3.71	oxido de cariofileno	1.613	1.586	C ₁₅ H ₂₄ O
3	36,133	1.12	beta.-himachalenoxid	1.610	1.570	C ₁₅ H ₂₄ O
4	37,024	5.32	3-ciclopentil-1-(2,4-dimetifenil)- 1-Propanona	-	1.575	C ₁₆ H ₂₂ O
5	37,424	11.88	alfa.-Bisabolol	1.680	1.647	C ₁₅ H ₂₆ O
6	37,969	1.03	n-Pentadecanol	1.772	1.730	C ₁₅ H ₃₂ O
7	38,296	0.72	11-Hexadecin-1-ol	1.863	1.820	C ₁₆ H ₃₀ O
8	38,531	0.61	1-Isopropil-4,7-dimetil-1,2,4a,5,6,8a-hexahidronaftaleno.	1.520	1.561	C ₁₅ H ₂₄ O
9	38,917	0.99	2-Butil-1-metil-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-ol	-	1.563	C ₁₅ H ₂₂ O
10	39,228	0.50	2-Acetoxi-1,1,10-trimetil-6,9-epidioxidecalino	-	1.564	C ₁₄ H ₂₄ O ₄
11	39,600	0.63	Globulol .	1.568	1.565	C ₁₅ H ₂₆ O
12	41,373	1.04	Ledol.	1.560	1.557	C ₁₅ H ₂₆ O
13	41,972	0.51	1,6-Dimetil-9-(1-metiletiidenil-5,12-dioxatriciclo[9.1.0.0(4,6)] 8-dodecanona.	-	1.545	C ₁₅ H ₂₂ O ₃
14	42,363	1.19	(+)-Ledol	1.580	1.546	C ₁₅ H ₂₆ O
15	42,546	0.52	7-(1,3-Dimetil-buta-1,3-dienil)-1,6,6-trimetil-3,8-dioxa-triciclo [5.1.0.0.2,4] octano.	-	1.547	C ₁₅ H ₂₂ O ₂
18	44,212	0.52	trans-Z.-alfa.-Bisabolen epoxido	-	1.553	C ₁₅ H ₂₄ O
19	44,659	0.94	1-Octadecanol	2.039	1.994	C ₁₈ H ₃₈ O

Fig 21 Cromatograma de *Gnaphalium pellitum.*(AV)



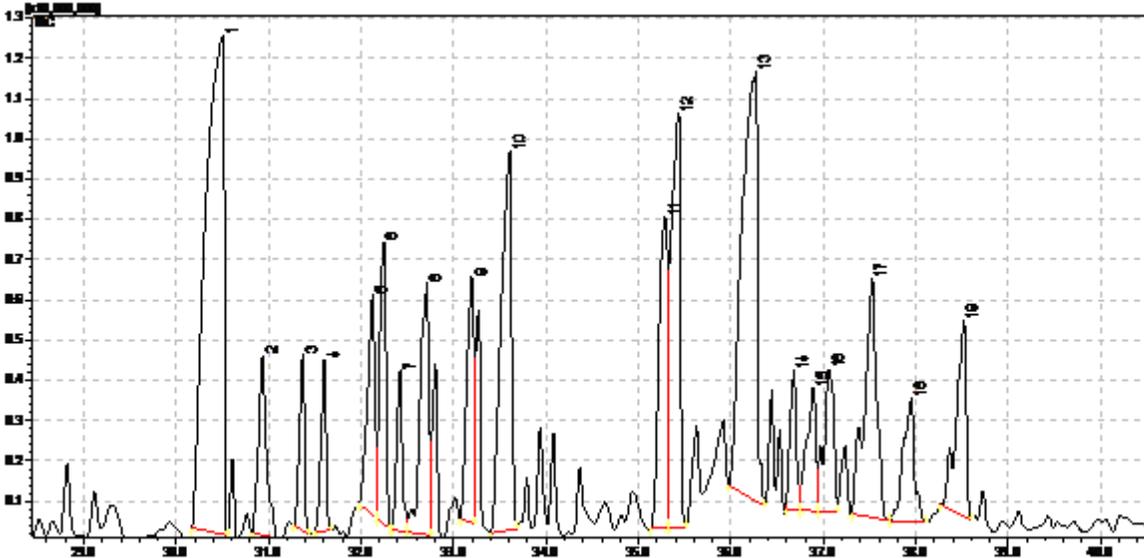


Tabla 10 Datos de *G pellitum*. AV. (Espectros de masas en el anexo 1 D)

	t R.	% area	Nombre	I _K . T	I _K . E	Formula
1	30,504	9.06	Cariofileno.	1.415	1.468	C ₁₅ H ₂₄
2	30,932	1.43	aromadendreno	1.440	1.502	C ₁₅ H ₂₄
3	31,368	0.88	alpha.-cariofileno.	1.451	1.505	C ₁₅ H ₂₄
4	31,603	0.87	1r,3z,9s-4,11,11-trimetil-8-metilenbicyclo[7.2.0]undec-3-eno		1.517	C ₁₅ H ₂₄
5	32,123	1.63	1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-7-metil-4-metenil-1-(1-metiletil)- (1.alpha.,4a.alpha.,8a.alpha.) naftaleno.	1.449	1.518	C ₁₅ H ₂₄
6	32,245	1.74	alpha.-curcumeno	1.475	1.522	C ₁₅ H ₂₂
7	32,420	0.89	7-isopropenil-4a-meti-1-metenildecahidronaftaleno.	1.485	1.524	C ₁₅ H ₂₄
8	32,708	2.21	(+)-Ledeno	1.488	1.526	C ₁₅ H ₂₄
9	33,196	1.85	Butilato de hidroxitolueno.	1.483	1.530	C ₁₅ H ₂₄ O
10	33,607	3.91	(1s-cis)-1,2,3,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil) naftaleno.	1.525	1.603	C ₁₅ H ₂₄
11	35,289	2.70	decahidro-1,1,7-trimetil-4-metenil- 1h-cicloprop[e]azulen-7-ol	1.578	1.627	C ₁₅ H ₂₄ O
12	35,433	3.79	1,1,4,7-tetrametildecahidro-1h-ciclopropa[e]azulen-4-ol	1.593	1.638	C ₁₅ H ₂₆ O
13	36,267	7.90	2,3,4,4a,5,6,7,8-octahidro-.alpha.,.alpha.,4a,8-tetrametil-, [2r-(2.alpha.,4a.beta.,8.beta.)] - 2-naftalenmetanol.	1.655	1.705	C ₁₅ H ₂₆ O
14	36,682	1.11	6-isopropenil-4,8a-dimetil-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-2-naftalenol	1.690	1.709	C ₁₅ H ₂₄ O
15	36,893	1.41	decahidro-.alpha.,.alpha.,4a-trimetil-8-metenil-, [2r-(2.alpha.,4a.alpha.,8a.beta.)]-2-naftalenmetanol.	1.649	1.701	C ₁₆ H ₂₆ O
16	37,062	2.94	tau.-cadinol	1.640	1.702	C ₁₅ H ₂₆ O
17	37,529	1.37	1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahidro-1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-, [1r-(1.alpha.,4.beta.,4a.beta.,8a.alpha.)]-1-naftalenol.	1.644	1.715	C ₁₅ H ₂₆ O
18	37,950	1.95	1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metil- 3-ciclohexen-1-ol	1.673	1.718	C ₁₅ H ₂₆ O
20	44,496	0.90	8-cedren-13-ol	1.687	1.720	C ₁₅ H ₂₄ O
21	45,234	13.11	(3e,6e,10e)-3,7,11,15-tetrametil-1,3,6,10,14-hexadecapenteno	1.969	1.925	C ₂₀ H ₃₂

Fig 22 Cromatograma de *Achyrocline satureioides* (HD).

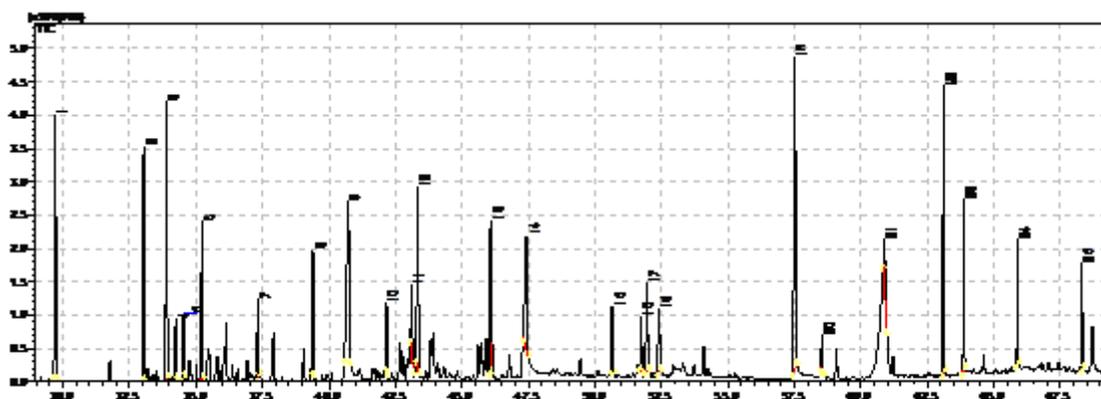
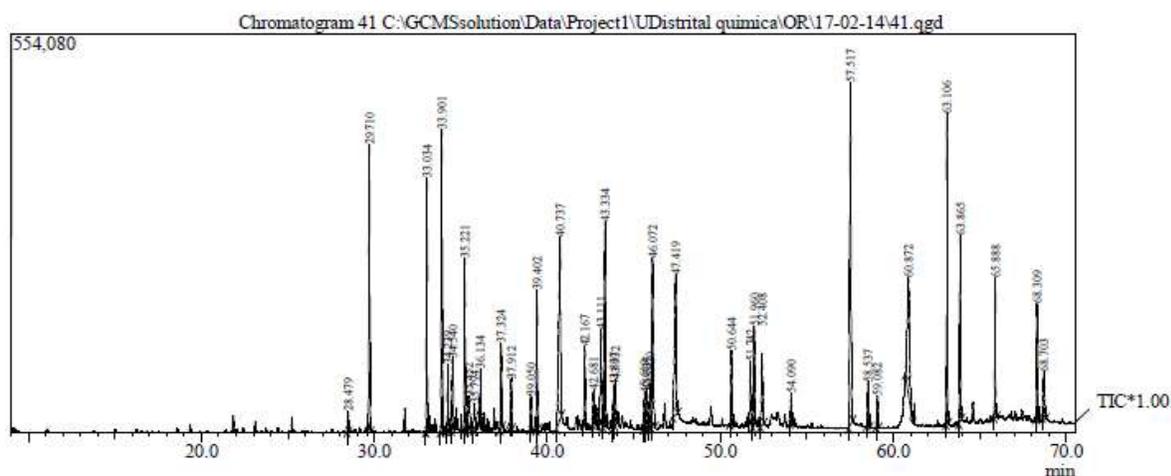


Tabla 11 Datos *A satureioides*. HD, (Espectros de masas en el anexo 1 E).

	t R.	% area	Nombre	I _K . T	I _K . E	Formula
1	29,710	6.84	4,4a,5,6,7,8-hexahidro- 2(3H)-Naftalenona	1.299	1.125	C ₁₀ H ₁₄ O
2	33,034	5.58	Butirato de hidroxitolueno	1.518	1.529	C ₁₅ H ₂₄ O
3	33,901	8.16	3,3,6,6-Tetrametoxi- 1,4-ciclohexadieno	-	1.036	C ₁₀ H ₁₆ O ₄
4	34,239	1.43	1-Metil-2,4-Bis(1-Metiletenil) (1.α.,2.β.,4.β.)- ciclohexano,	1.394	1.338	C ₁₃ H ₂₂
5	34,540	2.39	ácido tridecanoico	1.662	1.341	C ₁₃ H ₂₆ O ₂
6	35,221	4.34	1,1,4,7-Tetrametildecahidro-1h-ciclopropa[e]azulen-4-ol	1.593	1.546	C ₁₅ H ₂₆ O
7	37,324	2.23	Selina-6-en-4-ol	1.624	1.590	C ₁₅ H ₂₆ O
8	39,402	3.48	Tetradecanoato de metilo	1.726	1.676	C ₁₅ H ₃₀ O ₂
14	47,419	5.33	(Z)-Acido 9-octadecenoico	2.102	1.988	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
15	50,644	2.17	13-hexyl-oxa-ciclotridec-10-en-2-one	2.071	1.923	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
16	51,742	1.57	(Z,Z)-9,12-octa decadienoato de metilo.	2.099	1.935	C ₁₉ H ₃₄ O ₂
17	51,960	2.72	(Z,Z,Z)-9,12,15-Octadecatrienoato de metilo	2.105	2.083	C ₁₉ H ₃₂ O ₂
18	52,408	2.57	Fitol	2.111	2.093	C ₂₀ H ₄₀ O
20	58,537	1.11	Heneicosano	2.100	2.116	C ₂₁ H ₄₄
21	60,872	1.69	Tetracosano	2.400	2.453	C ₂₄ H ₅₀
22	63,106	6.09	hexacosano	2.600	2.641	C ₂₆ H ₅₄
24	65,888	2.35	nonacosano	2.900	2.900	C ₂₉ H ₆₀
25	68,309	2.37	Tetratriacontano	3.400	3.432	C ₃₄ H ₇₀

Fig 23 Cromatograma de *Achyrocline satureioides* (AV).

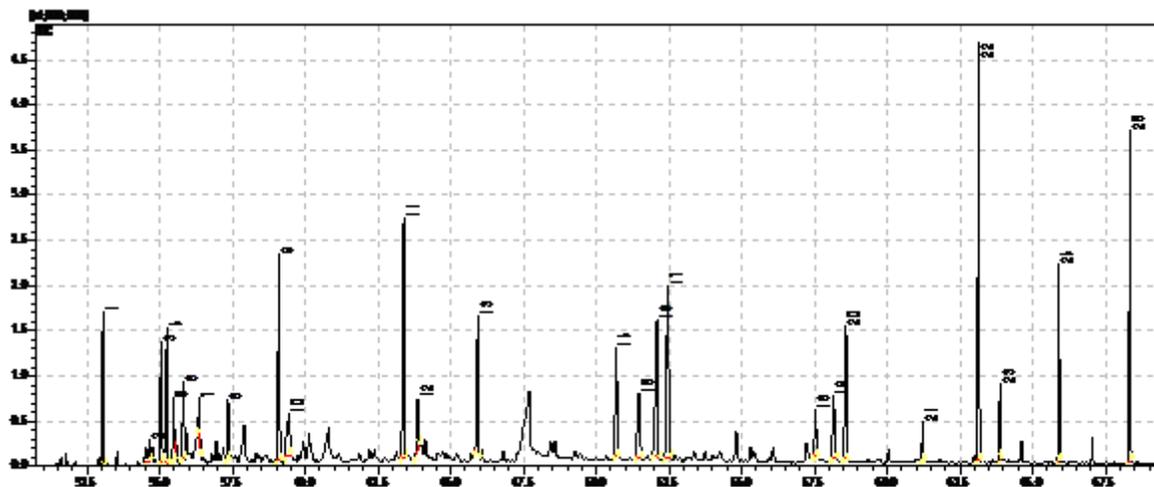
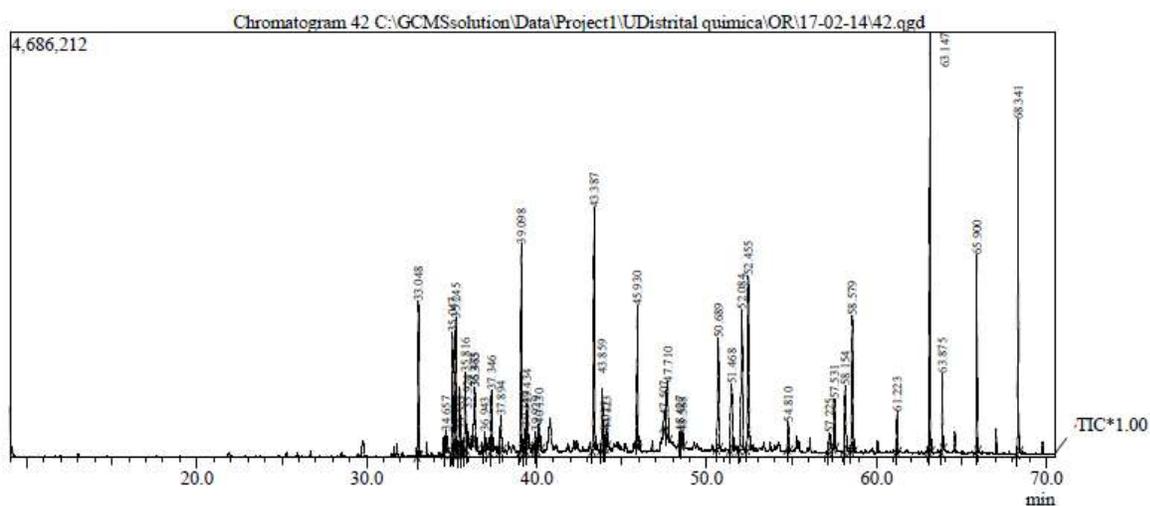


Tabla 12 Datos A *satureioides*. AV. (Espectros de masas en el anexo 1 F).

	t R.	% area	Nombre	I _K . T	I _K . E	Formula
1	33,048	3.94	Butirato de hidroxitolueno	1.517	1.529	C ₁₅ H ₂₄ O
2	34,657	1.18	Acido tetradecanoico	1.758	1.742	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
3	35,047	3.46	decahidro-1,1,7-trimetil-4-metenil-1h-cicloprop [e]azulen-7-ol,	1.571	1.545	C ₁₅ H ₂₄ O
4	35,245	4.56	(-)-Globulol	1.580	1.547	C ₁₅ H ₂₆ O
5	35,473	1.89	1,1,4,7-tetrametildecahidro-1h-ciclopropa[e]azulen-4-ol	1.580	1.548	C ₁₅ H ₂₆ O

6	35,816	2.29	Ledol	1.580	1.551	C ₁₅ H ₂₆ O
7	36,365	1.04	Geranil isovalerate	1.597	1.527	C ₁₅ H ₂₆ O ₂
8	37,346	1.89	Selina-6-en-4-ol	1.624	1.564	C ₁₅ H ₂₆ O
9	39,098	6.56	Pentadecanal	1.713	1.678	C ₁₅ H ₃₀ O
10	39,434	2.41	valerenol	1.711	1.652	C ₁₅ H ²⁴ O
11	43,387	8.45	6,10,14-trimetil 2-Pentadecanona,	1.848	1.773	C ₁₈ H ₃₆ O
14	50,689	4.00	13-Hexiloxaciclodec-10-en-2-one	2.071	2.024	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
15	51,468	3.56	acido, isohexil tetradecil ester oxalico	2.071	1.994	C ₂₂ H ₄₂ O ₄
17	52,455	7.55	2-Metil- Tricosano	2.365	2.439	C ₂₄ H ₅₀
18	57,531	1.62	Fitol	2.122	2.043	C ₂₀ H ₄₀ O
19	58,154	2.60	1-Tetracosanol		2.410	C ₂₄ H ₅₀ O
20	58,579	4.90	Hexacosano	2.600	2.656	C ₂₆ H ₅₄
21	61,223	1.01	Nonacosano	2.900	3.000	C ₂₉ H ₆₀
22	63,147	11.07	Triacontano	3.000	3.041	C ₃₀ H ₆₂
24	65,936	3.78	Tetratriacontano	3.400	3.451	C ₃₄ H ₇₀
25	68,341	8.17	Hexatriacontano	3.600	3.637	C ₃₆ H ₇₄

3.3 Actividad antioxidante por DPPH[•].

La actividad antioxidante de decoloración del radical DPPH[•] se determinó de acuerdo a los parámetros establecidos.

Preparación de la curva de referencia.

Para realizar la curva de referencia se prepararon soluciones de ácido ascórbico en concentraciones finales de 250, 125, 25, 2.5, 0.25 y 0.025 ppm de solución metanólica y se llevó a cabo la medición del porcentaje de captación de DPPH[•] empleando la técnica descrita en el numeral 2.5.5. Los resultados de la medición del porcentaje de captación de DPPH[•] se encuentran en la tabla 13

Tabla 13 Actividad antioxidante del ácido ascórbico. (patrón)

Tiempo (seg)	Abs. a 25 ppm	Abs. a 2,5 ppm	Abs. a 0,25 ppm	Abs. a 0,025 ppm
ERROR RELATIVO	0,420	0,211	0,137	0,109
Captación	0,923	0,467	0,304	0,238
% captacion	92,31	46,68	30,44	23,85
log c	1,398	0,398	-0,602	-1,602

Se presentan la actividad antioxidante de *Conyza bonariensis* (HD) y (AV), *Gnaphaliun pellitum* ((HD) y (AV) y (HD) y *Achyrocline sareioides* (HD) (AV), tablas 14 al 19.

Tabla 14 Actividad antioxidante del aceite de *Conyza bonariensis* (HD)

Tiempo (seg)	Abs. a 250ppm	Abs. a 125ppm	Abs. a 25ppm	Abs. a 2,5ppm
ERROR RELATIVO	0,205	0,180	0,154	0,118
Captación	0,479	0,422	0,361	0,272
% captacion	47,90	42,25	36,12	27,20
log c	2.40	2,10	1,40	0,40

Tabla15 Actividad antioxidante del aceite de *Conyza bonariensis* (AV)

Tiempo (seg)	Abs. a 250ppm	Abs. a 125ppm	Abs. a 25ppm	Abs. a 2,5ppm
ERROR RELATIVO	0,2205	0,1615	0,137	0,1245
Captación	0,4613	0,3800	0,3186	0,2830
% captacion	46,13	38,00	31,86	28,30
log c	2.40	2,10	1,40	0,40

Tabla 16 Actividad antioxidante del aceite de *Gnaphaliun pellitum* (HD).

Tiempo (seg)	Abs. a 250ppm	Abs. a 125ppm	Abs. a 25ppm	Abs. a 2,5ppm
ERROR RELATIVO	0,2305	0,174	0,135	0,119
Captación	0,4822	0,4244	0,3277	0,2867
% captación	48,22	42,44	32,77	28,67
log c	2.40	2,10	1,40	0,40

Tabla 17 Actividad antioxidante del aceite de *Gnaphaliun pellitum* (AV).

Tiempo (seg)	Abs. a 250ppm	Abs. a 125ppm	Abs. a 25ppm	Abs. a 2,5ppm
ERROR RELATIVO	0,1345	0,1265	0,1095	0,0865
Captación	0,3484	0,3131	0,2751	0,2282
% captación	34,84	31,31	27,51	22,82
log c	2.40	2,10	1,40	0,40

Tabla 18 Actividad antioxidante del aceite de *Achyrocline satuireioides* (HD)

Tiempo (seg)	Abs. a 250ppm	Abs. a 125ppm	Abs. a 25ppm	Abs. a 2,5ppm
ERROR RELATIVO	0,202	0,1465	0,117	0,098
Captación	0,4114	0,3330	0,2862	0,2396
% captación	41,14	33,30	28,62	23,96
log c	2.40	2,10	1,40	0,40

Tabla 19. Actividad antioxidante del aceite de *Achyrocline satuireioides* (AV)

Tiempo (seg)	Abs. a 250ppm	Abs. a 125ppm	Abs. a 25ppm	Abs. a 2,5ppm
ERROR RELATIVO	0,2	0,1875	0,145	0,1
Captación	0,4444	0,4190	0,3258	0,2500
% captación	44,44	41,90	32,58	25,00
log c	2.40	2,10	1,40	0,40

3.4 Actividad antibacteriana.

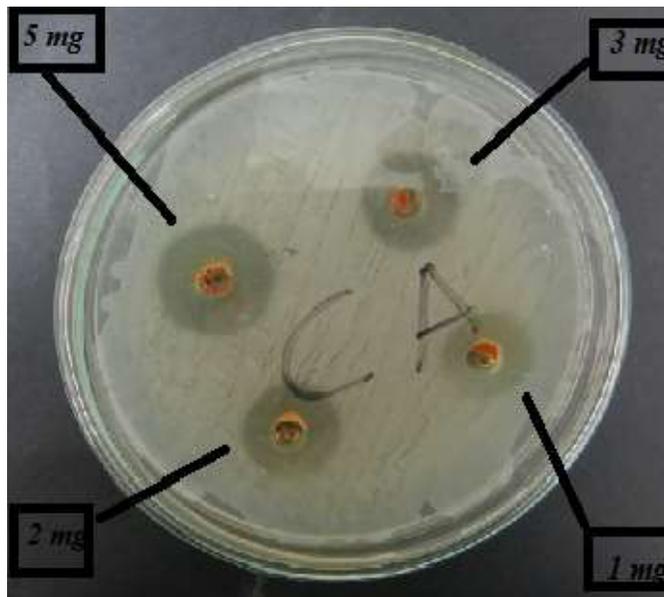


Fig. 24 halos de *C. bonariensis* y *Staphylococcus aureus* (Autor)

A los aceites esenciales de hojas de *Achyrocline satureioides*, *Gnaphalium pellitum* y *Conyza bonariensis*, se le determinó la actividad antimicrobiana frente a los microorganismos *Staphylococcus aureus* Gram (+), *Pseudomona aeruginosa* Gram (-), *Proteus mirabilis* Gram (-), *Staphylococcus epidermidis* Gram (+), y *Escherichia coli* Gram (-), utilizando el método de difusión en gel por perforación en placa, como control negativo DMSO y Control Positivo: Rifaximina. Obteniéndose los datos reportados en las tablas 20 a 24.

Tabla 20. Aceites y bacterias *Staphylococcus aureus*.

ACEITE ESENCIAL		BACTERIA			
		<i>Staphylococcus aureus</i>			
HOJAS DE PLANTA	METODO OBTENCIÓN	Halo mm según mg de Aceite.			
		1mg	2 mg	3 mg	5 mg
<i>Achyrocline satureioides</i>	Arrastre por vapor	18	19	20	21
<i>Achyrocline satureioides</i>	Hidrodestilación	14	15	16	17
<i>Gnaphalium pellitum</i>	Arrastre por vapor	17	18	19	20
<i>Gnaphalium pellitum</i>	Hidrodestilación	13	15	19	20
<i>Conyza bonariensis</i>	Arrastre por vapor	19	20	22	25
<i>Conyza bonariensis</i>	Hidrodestilación	16	17	18	20
ANTIBIOTICO		Halo en mm			
RIFAXIMINA		34	36	38	40

Tabla 21. Aceites y bacterias *Pseudomona aeruginosa*

ACEITE ESENCIAL		BACTERIA			
		<i>Pseudomona aeruginosa</i>			
HOJAS DE PLANTA	METODO OBTENCIÓN	Halo mm según mg de Aceite.			
		1mg	2 mg	3 mg	5 mg
<i>Achyrocline satureioides</i>	Arrastre por vapor				
<i>Achyrocline satureioides</i>	Hidrodestilación	-	-	-	-
<i>Gnaphalium pellitum</i>	Arrastre por vapor	-	-	-	-
<i>Gnaphalium pellitum</i>	Hidrodestilación	-	-	-	-
<i>Conyza bonariensis</i>	Arrastre por vapor	14	20	21	23
<i>Conyza bonariensis</i>	Hidrodestilación	-	-	-	-
ANTIBIOTICO		Halo en mm			
RIFAXIMINA		19	20	21	22

Tabla 22 Aceites y Bacterias *Proteus mirabilis*

ACEITE ESENCIAL		BACTERIA			
		<i>Proteus mirabilis</i>			
HOJAS DE PLANTA	METODO OBTENCION	Halo mm			
		1mg	2 mg	3 mg	5 mg
Achyrocline satureioides	Arrastre por vapor	11	12	14	15
Achyrocline satureioides	Hidrodestilación	11	13	20	22
Gnaphalium pellitum	Arrastre por vapor	-	-	-	-
Gnaphalium pellitum	Hidrodestilación	-	-	-	-
Conyza bonariensis	Arrastre por vapor	-	-	-	-
Conyza bonariensis	Hidrodestilación	-	-	-	-
ANTIBIOTICO		Halo en mm			
RIFAXIMINA		12	15	17	20

Tabla 23. Aceites y Bacterias *Staphylococcus epidermidis*.

ACEITE ESENCIAL		BACTERIA			
		Halo mm			
HOJAS DE PLANTA	METODO OBTENCION	Halo mm			
		1mg	2 mg	3 mg	5 mg
Achyrocline satureioides	Arrastre por vapor	13	15	16	17
Achyrocline satureioides	Hidrodestilación	-	-	-	-
Gnaphalium pellitum	Arrastre por vapor	-	-	-	-
Gnaphalium pellitum	Hidrodestilación	-	-	-	-
Conyza bonariensis	Arrastre por vapor	16	17	19	22
Conyza bonariensis	Hidrodestilación	14	15	16	19
ANTIBIOTICO		Halo en mm			
RIFAXIMINA		25	26	27	29

Tabla 24 Aceites y Bacterias *Escherichia coli*.

ACEITE ESENCIAL		BACTERIA <i>Escherichia coli</i>			
HOJAS DE PLANTA	METODO OBTENCIÓN	Halo mm			
		1mg	2 mg	3 mg	5 mg
<i>Achyrocline satureioides</i>	Arrastre por vapor	13	15	16	17
<i>Achyrocline satureioides</i>	Hidrodestilación	-	-	-	-
<i>Gnaphalium pellitum</i>	Arrastre por vapor	-	-	-	-
<i>Gnaphalium pellitum</i>	Hidrodestilación	-	-	-	-
<i>Conyza bonariensis</i>	Arrastre por vapor	16	17	19	22
<i>Conyza bonariensis</i>	Hidrodestilación	14	15	16	19
ANTIBIOTICO		Halo en mm			
RIFAXIMINA		16	20	22	24

4 ANALISIS DE RESULTADOS.

4.1 Identificación taxonómica de las plantas.

Esta identificación se realizó en el Herbario Nacional Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional. Las muestras botánicas se encuentran catalogadas. Como *Gnaphalium aff. pellitum* Kunth, *Achyrocline satureioides* y *Conyza aff. bonariensis*. Las plantas fueron identificadas y clasificadas por el Biólogo Carlos Alberto Parra. (Ver anexo 4)

4.2 Porcentaje de rendimiento.

El porcentaje de rendimiento reportado en la tabla 25, resulta del promedio de 2 réplicas de los aceites esenciales obtenidas por cada método, de cada planta, calculados de acuerdo con la ecuación 1.

Tabla 25. Rendimiento del proceso de extracción y densidad.

PLANTA	Proceso	Peso Hojas(g)	Peso aceite (g)	Rendimiento(%)	Densidad mg/μL
<i>Conyza bonariensis</i>	HD	144,03	0,846	0,59	0.895
	AV	185,2	0,910	0,49	0.853
<i>Gnaphalium pellitum</i>	HD	167,33	0,762	0,46	0.928
	AV	200,31	0,778	0,39	0.787
<i>Achyrocline satureioides</i>	HD	195,341	0,855	0,44	0.813
	AV	185,253	0,640	0,35	0.765

AV= arrastre por vapor

HD= Hidrodestilación

El rendimiento de los Aceites esenciales de las hojas expresado en porcentaje (gramos de aceite obtenido por cada 100 g de muestra) se encontró entre 0.35% y 0,59% para hojas, dependiendo del método empleado. Se observa que para las muestras de *Conyza bonariensis*, *Gnaphalium pellitum* y *Achyrocline satureioides*, el método de hidrodestilación presentó un rendimiento mayor en todos los casos, comparado con el rendimiento de arrastre por vapor. También se puede observar que los rendimientos en ambos proceso son muy similares; es decir que la producción del aceite no se afecta por cambios ambientales.

Teniendo en cuenta el rendimiento de la obtención de aceite esencial obtenido de *Conyza bonariensis*, *Gnaphalium pellitum* y *Achyrocline satureioides* resulta bueno, si se tiene en cuenta que en algunos casos no se obtienen aceites esenciales por estos dos métodos. Por tanto en caso de que la composición química de este aceite esencial genere interés a nivel industrial, puede considerarse la *Conyza bonariensis*, *Gnaphalium pellitum* y *Achyrocline satureioides* como una especie promisoría para la comercialización de este tipo de metabolitos. Lo anterior toma mayor valor, considerando que el material vegetal proviene de plantas no cultivadas.

En cuanto a la densidad se puede observar que los datos son similares según la planta, teniendo resultados entre 0,765 y 0,928 mg/μL, las densidades mayores se obtuvieron para el método de hidrodestilación, comparado con la misma planta pero por el método de arrastre por vapor.

4.3 Identificación de los compuestos presentes en los aceites esenciales.

Los constituyentes de cada uno de los aceites esenciales aislados de hojas frescas de *Gnaphalium pellitum*, *Achyrocline satureioides* y *Conyza bonariensis* se analizaron mediante la técnica CG-EM, siguiendo los parámetros operacionales descritos en el numeral 2.4.

4.3.1 Identificación de los aceites esenciales obtenidos de las hojas.

Se observa que el resultado de los compuestos obtenidos de *C bonariensis* HD por el método de Hidrodestilación el 75 % corresponde a hidrocarburos alifáticos, 10% sesquiterpenos, 10 % aromático, 5 % diterpenos El hexadecanoato de etilo (palmitato de etilo) es un compuesto usado para la industria de los jabones. Mientras el tetradecanoato de 2 propilo (miristato de isopropilo) es usado para elaborar cremas cuya función es proteger la piel.

C bonariensis por el método de arrastre por vapor se presenta un 68,42 % de sesquiterpenos y 31, 58% de hidrocarburos alifáticos y 5, 26% de diterpenos.

El globulol hace parte de aceites como el del eucalipto, no se tiene un uso específico, el 1-heptatriacontanol, hace parte de muchas muestras botánicas que se encuentran en estudios.

Para *G pellitum*.HD se obtuvo un 60% de hidrocarburos alifáticos, un 25% de compuestos aromáticos y 15% de sesquiterpenos. El alfa-bisabolol es utilizado en la

industria cosmética, se la atribuyen propiedades suavizantes, cicatrizantes y calmantes.

En *G pellitum*. AV se obtuvieron un 35% de hidrocarburos alifáticos, 35 % de sesquiterpenos y 30 % de aromáticos. El cariofileno hace parte de las sustancias que se le atribuye propiedades para provocar la secreción de la insulina.

En *A satureioides*. HD la muestra contenía un 75% de hidrocarburos alifáticos, 15% de aromáticos y 10 % de sesquiterpenos. El tetracontano es utilizado como aceite lubricante y como combustible por ser un hidrocarburo de cadena larga. El ácido tridecanoico, hace parte de los ácidos orgánicos utilizados en la industria de alimentos como grasas naturales.

A satureioides. AV Esta muestra contenía un 70% de hidrocarburos alifáticos, 15% de sesquiterpenos, 10% de aromáticos y 5% de diterpeno. El Hexatriacontano es un compuesto que hace parte de los hidrocarburos de cadena larga usado como combustible. No reporta uso exclusivo.. Es el componente activo en la industria de perfumería (Jazmin).

Al ordenar según % de área de cada muestra se obtienen los siguientes compuestos como los más representativos posibles como constituyentes del aceite de *C bonariensis* HD con [16.00% Hexadecanoato de etilo, 10,52%, tetradecanoato de 2-propilo, 9,30%, Hexadecanoato de metilo, 7,42%, 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona] *C. bonariensis* AV, [18.50%Globulol, 8.19% (z) 7- Hexadecenal. 6.75% Epiglobulol, 5,44% viridiflorol.], *G. pellitum* HD [11.88% (Alfa- bisabolol, 5.32% 3-ciclopentil-1-(2,4-dimetilfenil)-1-propanona, 3.71% oxido de cariofileno]. *G. pellitum* AV [13.11% (3e,6e,10e)-3,7,11,15-tetrametil-1,3,6,10,14-hexadecapenteno , 9.06% Cariofileno, 7.90% 2,3,4,4a,5,6,7,8-octahidro-. α , α ,4a,8-tetrametil-[2r-(2. α ,4a. β ,8. β .)]2-naftalenmetanol.], *A. satureioides* HD [8.16% 3,3,6,6-Tetrametoxi-1,4-ciclohexadieno, 6.84% 4,4a,5,6,7,8-hexahidro-2(3H)-Naftalenona, 6.09% hexacosano], *A. satureioides* AV [11,07% Triacontano, 8.45% 6,10,14-trimetil 2-Pentadecanona, 8.17% Hexatriacontano),.Donde se observa que un porcentaje considerable son sesquiterpenos y compuestos hidrocarbonados. Debido a que para este análisis se tiene en cuenta los patrones, los tiempos de retención y el número de carbonos que debe tener el posible compuesto. Al observar los compuestos se puede evidenciar la presencia de Fitol, Globulol y cariofileno. en los diferentes aceites esenciales.

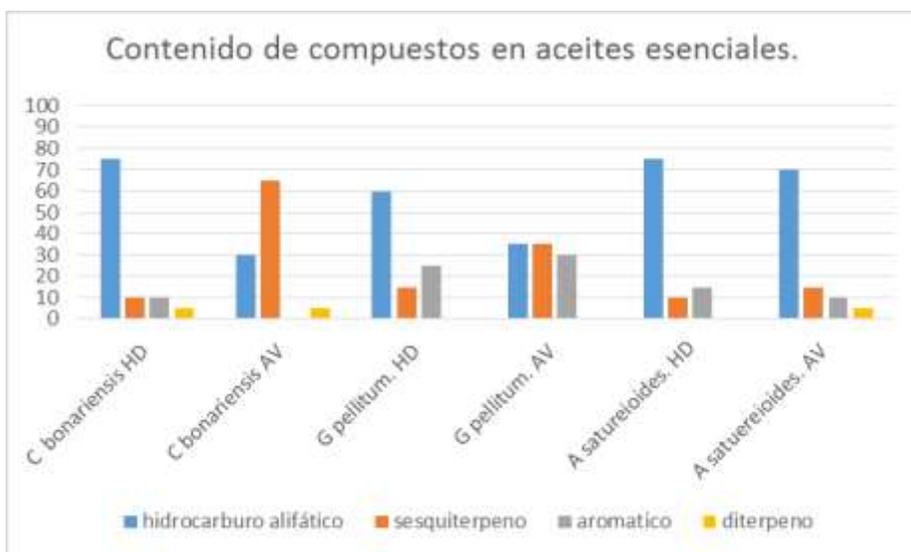


Fig 25 Resultado % de aceites según planta.

Los compuestos denominados hidrocarburos alifáticos están presentes en todos los aceites, ya que en este grupo se clasificaron los alcoholes, cetonas. Se observa que en las *Achyrocline Satureioides* es similar el contenido de hidrocarburos alifáticos, sin importar el método de obtención, en relación con otros componentes. Mientras que para la *Conyza bonariensis* si se ve la influencia del método de obtención. En cuanto a la *Gnaphalium pellitum* no se relaciona el método de obtención con respecto a los compuestos obtenidos ya que se puede ver que no se encuentran sustancias similares por el método AV y HD.

Cabe anotar que se encuentran presentes algunos aceites como el globulol y el cariofileno en varias plantas de estudio.

4.4 Actividad antioxidante.

Actividad antioxidante de los aceites de *Conyza bonariensis*, *Gnaphalium pellitum* y *Achyrocline satureioides* por las técnicas e hidrodestilación y arrastre de vapor se evaluó a 250, 125 y 2,5 ppm, mediante la aplicación del método decoloración del radical DPPH*. Para éste método observamos que hay tendencia de mayor actividad antioxidante a medida que aumenta la concentración en las soluciones de trabajo de los extractos.

La capacidad antioxidante de los aceites es equivalente al patrón de referencia el ácido ascórbico a 2,5 ppm como se observa en la figura 26. A 25 ppm o mayor estará fuera de

rango de comparación ver figura 27

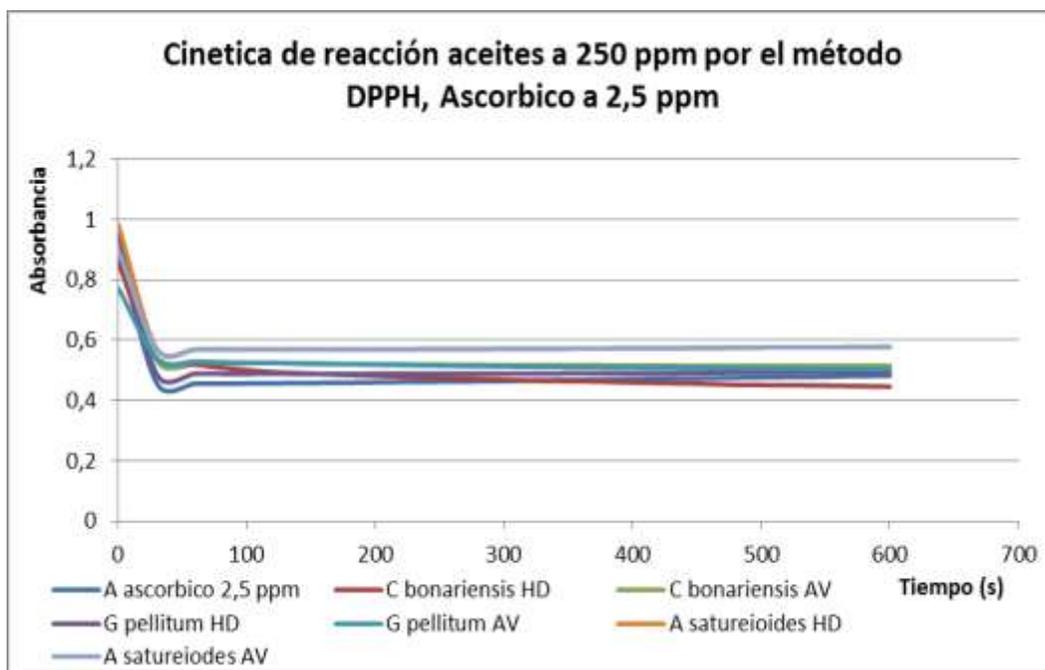


Fig. 26 Relación aceites y patrón de referencia a 2,5 ppm.

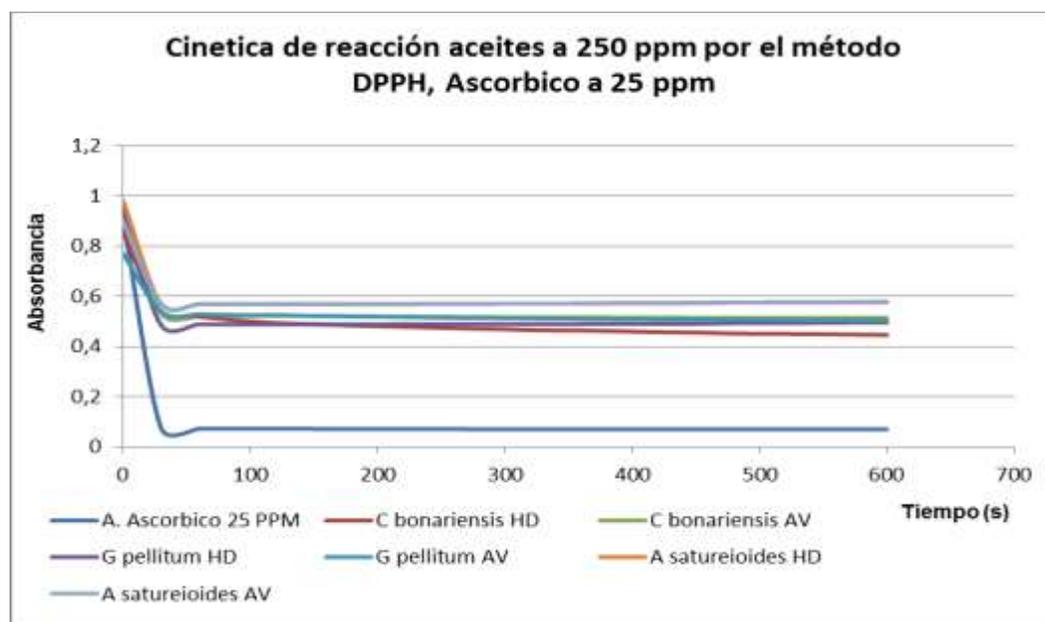


Fig. 27. Relación aceites y patrón de referencia a 25 ppm.

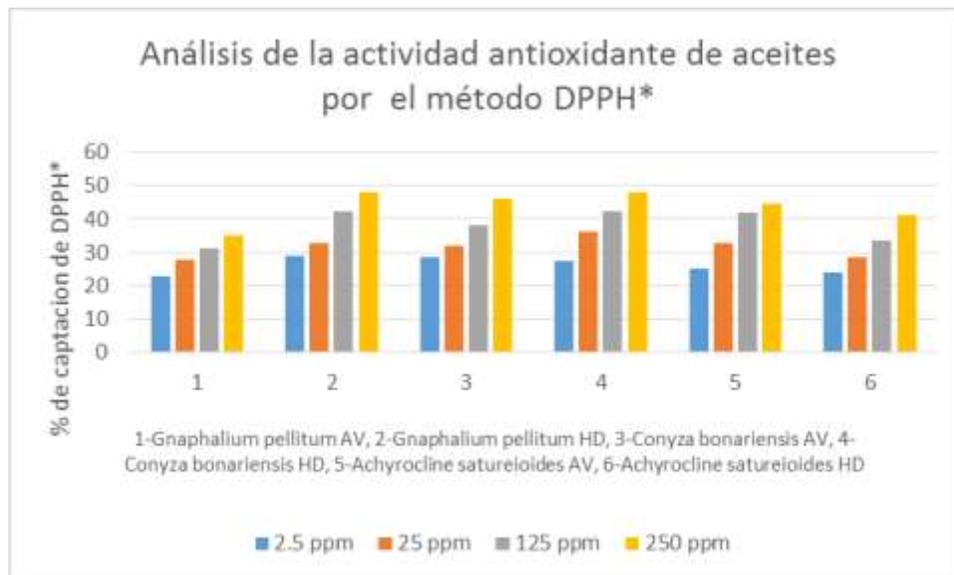


Figura 28. Comparación de aceites de 1-*Gnaphalium pellitum* AV, 2-*Gnaphalium pellitum* HD, 3-*Conyza bonariensis* AV, 4-*Conyza bonariensis* HD, 5-*Achyrocline satureioides* AV, 6-*Achyrocline satureioides* HD, por el método decoloración del radical DPPH*. (Fuente: Autor).

Con base en las curvas concentración vs porcentaje obtenidas se obtuvieron las ecuaciones de las curvas, las cuales se utilizaron para calcular el IC 50 de cada uno de los mencionados aceites esenciales (figuras 29 a 35).

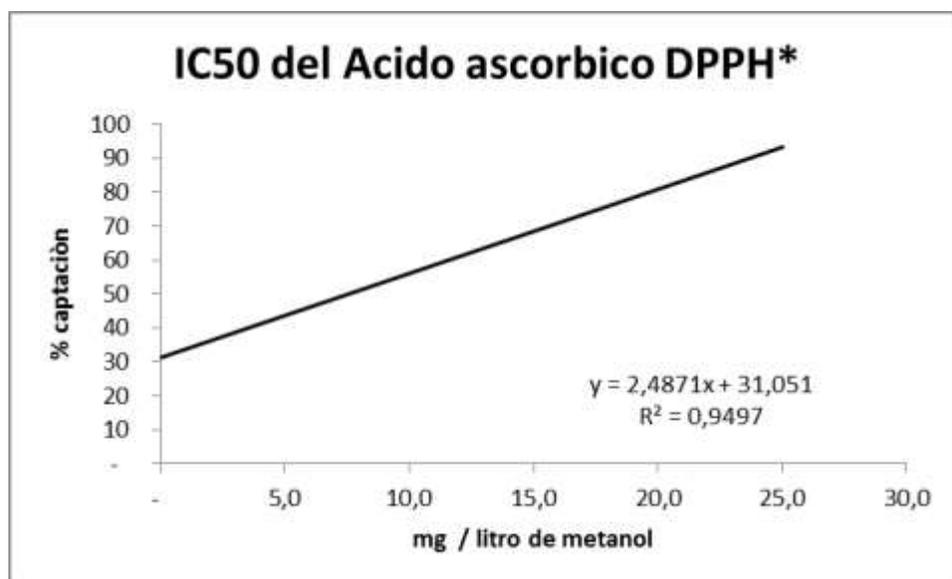


Fig. 29. IC₅₀ Patrón (ácido ascórbico).

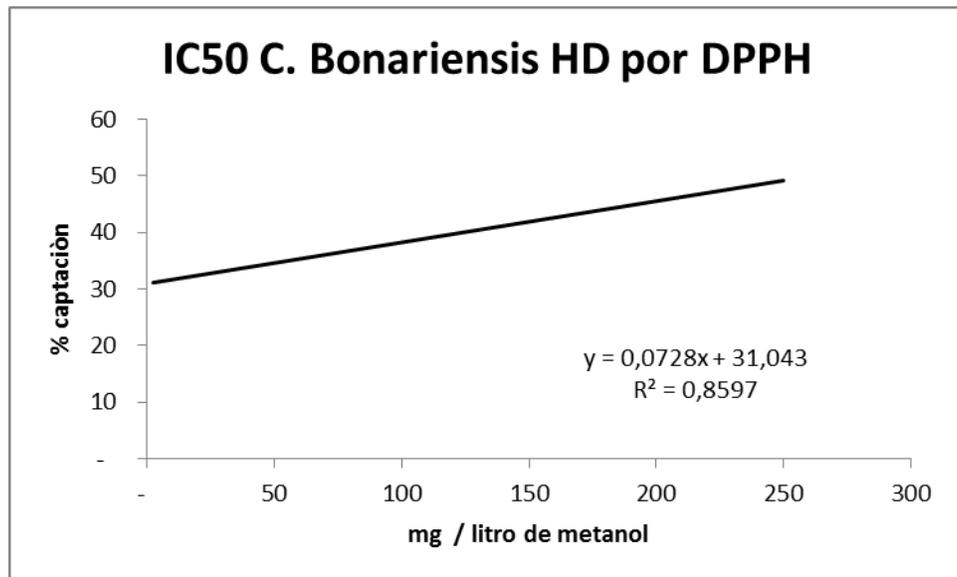


Fig. 30 IC₅₀ de *C Bonariensis* (HD) por DPPH*

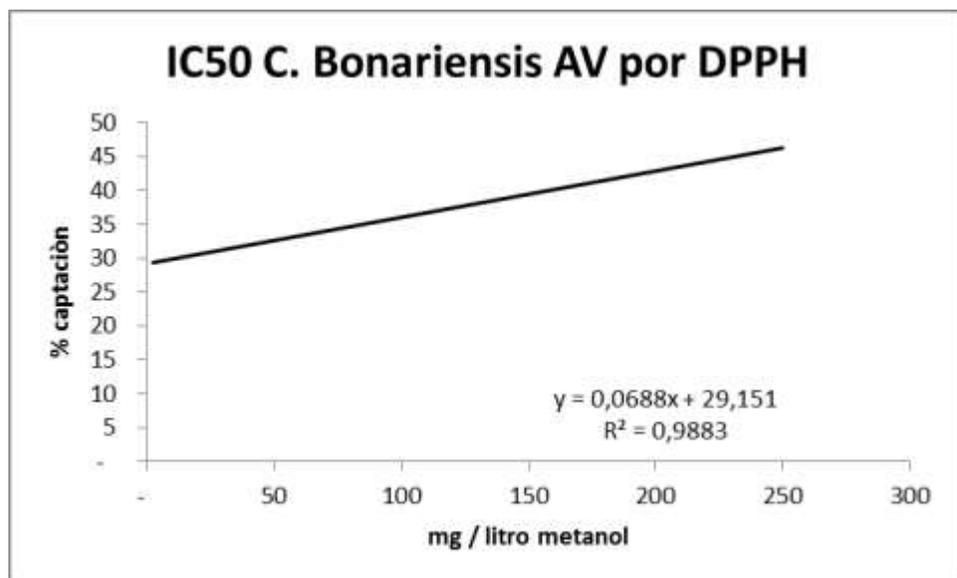


Figura 31 IC₅₀ de *C bonariensis* (AV) por DPPH*.

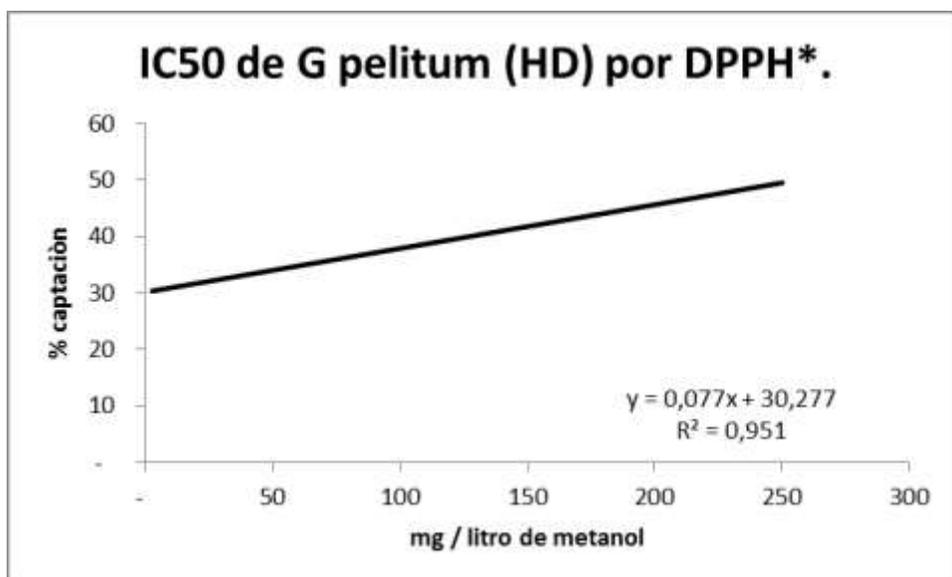


Fig. 32 IC_{50} de *G pelitum* (HD) por DPPH*.

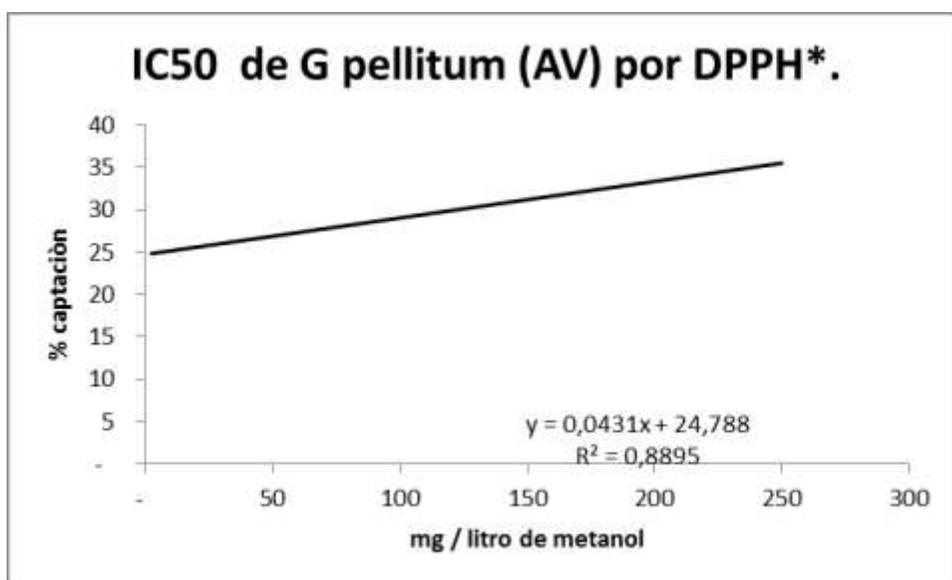


Fig. 33 IC_{50} de *G pellitum* (AV) por DPPH*.

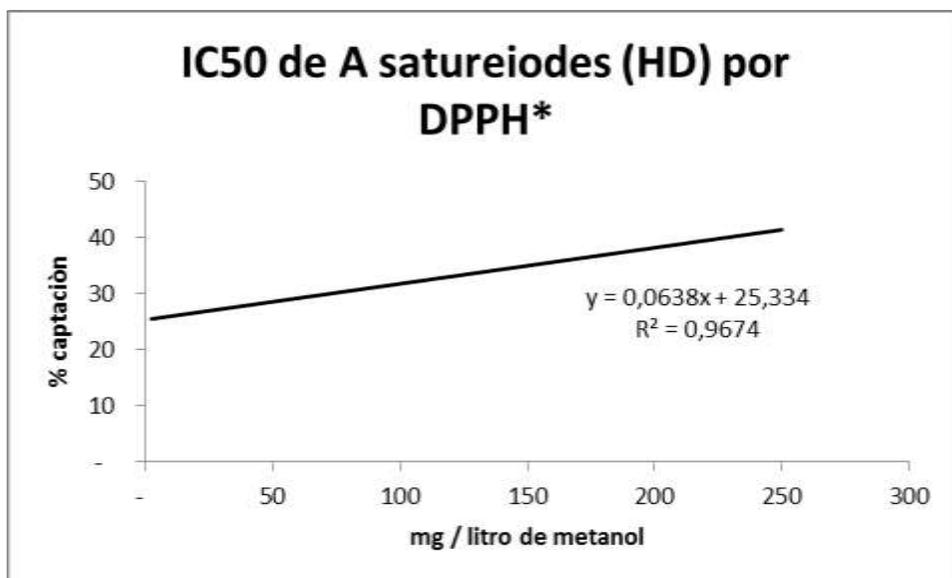


Fig. 34. IC₅₀ de *A satureioides* (HD) por DPPH*

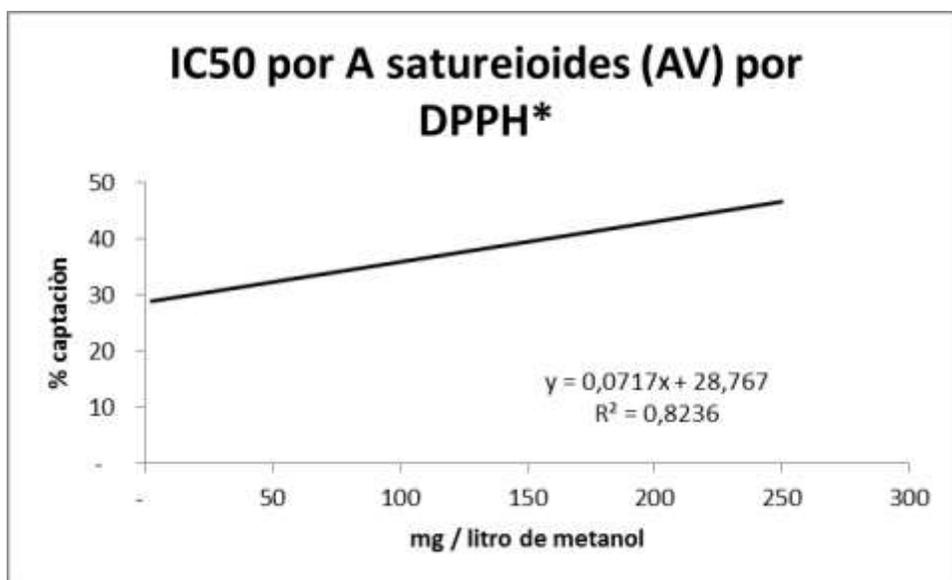


Figura 35 IC₅₀ por *A satureioides* (AV) por DPPH*

La actividad antioxidante relativa (AAR), de aceites por el método de barrido de radicales libres se calculó con la ecuación 6

El AAR, muestra el comportamiento similar de los aceites analizados los resultados se presentan en porcentaje actividad antioxidante relativa entre 48,4 % y 61,9%. El aceite presenta mayor %AAR es el de *Conyza bonariensis*

Tabla 26 Resultados Antioxidantes. IC₅₀

ACEITE DE HOJAS	método	(IC ₅₀)	1/ (IC ₅₀)	(1/ (IC ₅₀ muestra)) / (1/ (IC ₅₀ patròn)) * 100)
<i>Gnaphalium pellitum</i>	Hidrodestilación	256,12	0,0039	3,0
<i>Gnaphalium pellitum</i>	Arrastre por vapor	585,25	0,0017	1,3
<i>Achyrocline satureioides</i>	Hidrodestilación	386,54	0,0026	2,0
<i>Achyrocline satureioides</i>	Arrastre por vapor	296,13	0,0034	2,6
<i>Conyza bonariensis</i>	Hidrodestilación	260,46	0,0038	2,9
<i>Conyza bonariensis</i>	arrastre por vapor	303,15	0,0033	2,5

(AAR) Actividad Antioxidante Relativa con respecto al ácido ascórbico.

(IC₅₀) Coeficiente de inhibición media.

En las tablas se encuentran los resultados obtenidos de la actividad antioxidante de los aceites esenciales, en ella se describe el aceite evaluado, concentración inicial, diluciones evaluadas, el cálculo del porcentaje de inhibición obtenido de las dos replicas para cada dilución, el promedio y su comportamiento.

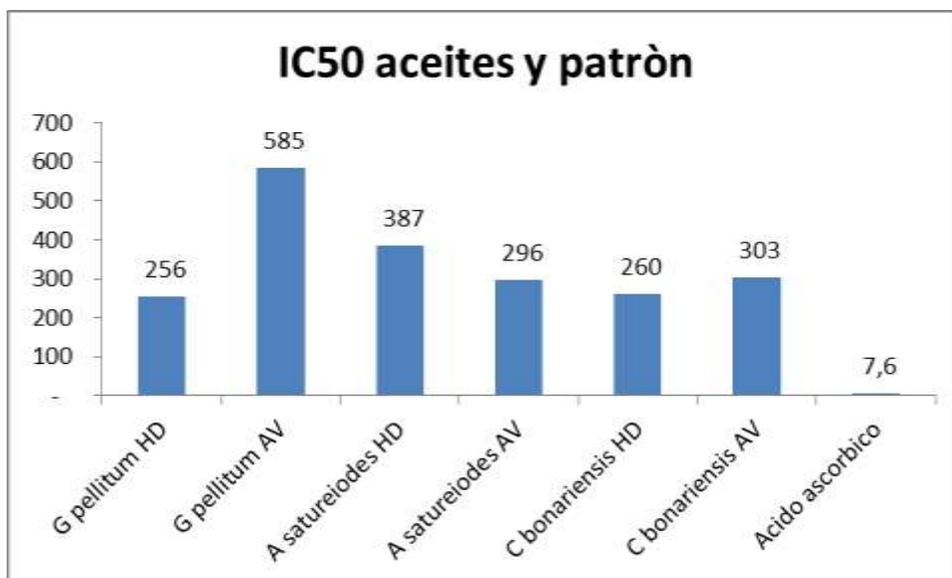


Fig. 36 Aceites vs % captación.

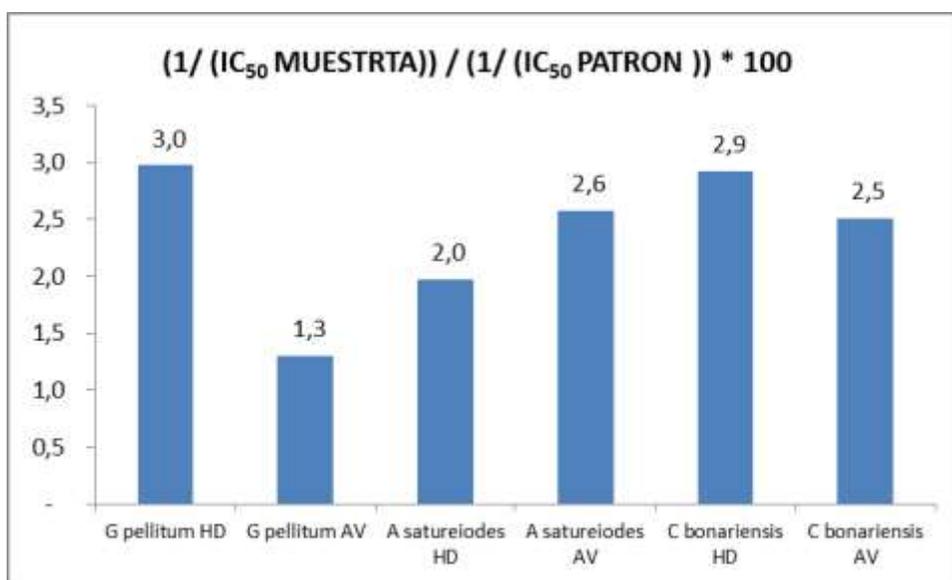


Fig. 37 Aceites Vs $(1/ (IC_{50} \text{ muestra})) / (1/ (IC_{50} \text{ patròn})) * 100$

4.4.1 Análisis estadístico de la actividad antioxidante.

ANTIOXIDANTES-FACTORIAL PLANTA Y TIPO DE DESTILACION

RESPUESTA LOG IC50

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error^a

Tabla 27 Variable dependiente: RtaLOGic50

F	gl1	gl2	Sig.
,046	5	12	,998

Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.

a. Diseño: Intersección + Planta + Metodo + Planta * Metodo

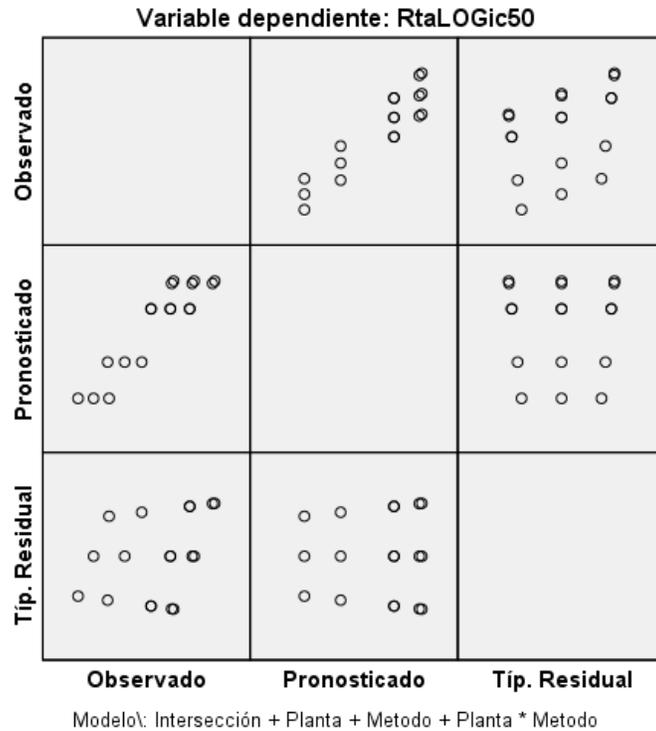


Fig. 38 Pruebas de los efectos inter-sujetos

Tabla 28 Resultado variable dependiente: RtaLOGic50

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	224,080 ^a	5	44,816	13,650	,000
Intersección	23414,480	1	23414,480	7131,748	,000
Planta	51,730	2	25,865	7,878	,007
Método	27,380	1	27,380	8,340	,014
Planta * Método	144,970	2	72,485	22,078	,000
Error	39,398	12	3,283		
Total	23677,958	18			
Total corregida	263,478	17			

a. R cuadrado = ,850 (R cuadrado corregida = ,788)

PRUEBAS POST HOC

Planta

Tabla 29 RtaLOGic50

	Planta	N	Subconjunto	
			1	2
DHS de Tukey ^{a,b}	1,00	6	34,6500	
	2,00	6	35,1000	
	3,00	6		38,4500
	Sig.		,904	1,000
Scheffe ^{a,b}	1,00	6	34,6500	
	2,00	6	35,1000	
	3,00	6		38,4500
	Sig.		,912	1,000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 3,283.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000

b. Alfa = ,05.

Se cumplieron todos los supuestos de la estadística paramétrica como se evidencia en la gráfica de residuales presentada y en la prueba de LEVENE.

Se encontraron diferencias significativas después de aplicar una prueba de anova a un diseño factorial, se encontró que la interacción de la planta con el método de extracción tiene un efecto combinado en la respuesta $p < 0,05$, lo que permite rechazar la hipótesis nula y definir que estas dos variables interaccionan en la respuesta.

Dado que se presentó significancia en la interacción, se definió que la planta 1 y 3 se comportan de manera similar bajo el método de extracción dos, cuando el método de extracción cambia la respuesta a nivel antioxidante es la misma para la planta 2 y 3 acorde con la gráfica de medias presentada. (Plantas 1- *Gnaphalium pellitum*, 2 - *Achyrocline satureioides* y 3- *Conyza bonariensis*)

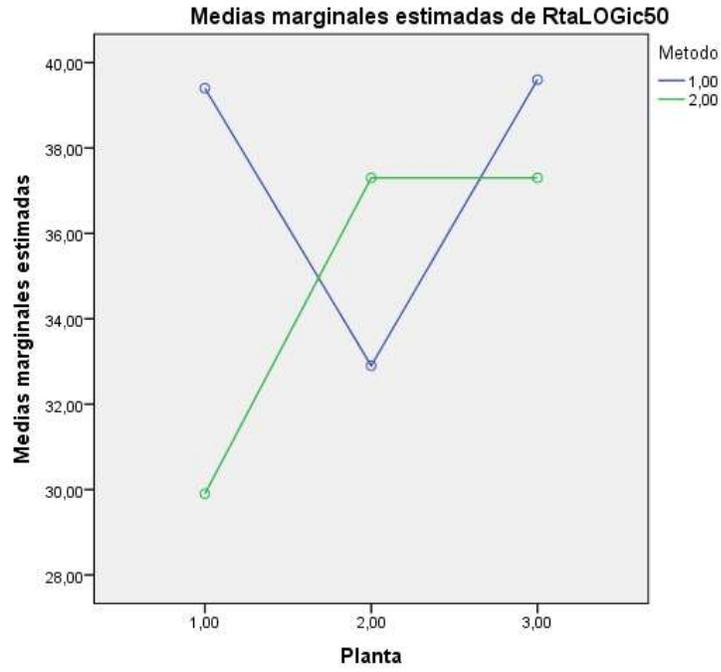


Fig 39 Medidas marginales plantas.

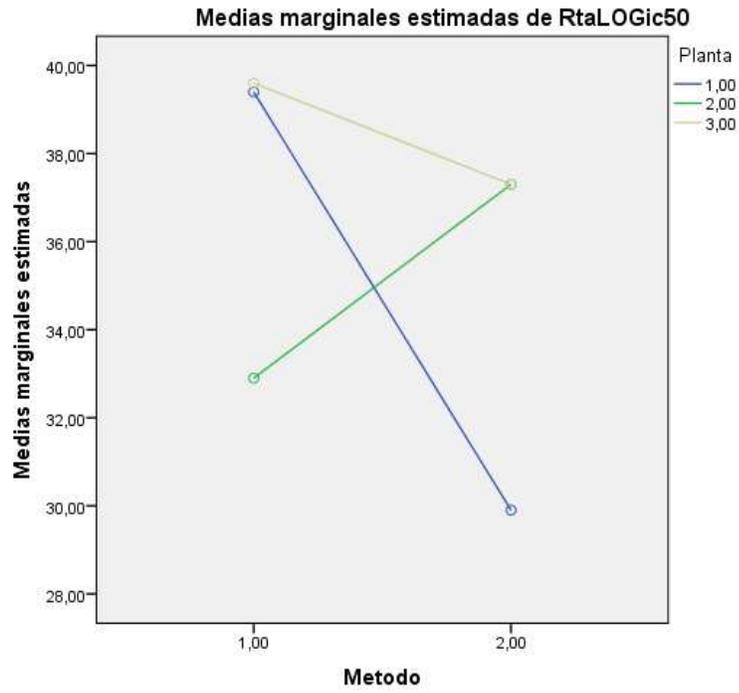


Fig 40 Medidas marginales Método.

RESPUESTA AAR

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error^a

Tabla 30 Variable dependiente: RTA

F	gl1	gl2	Sig.
,148	5	12	,977

Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.

a. Diseño: Intersección + Planta + Metodo + Planta * Metodo

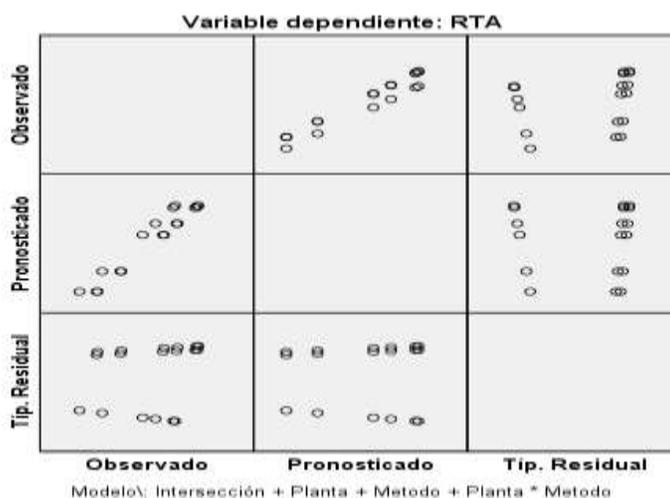


Fig 41 Estadístico planta- método

Tabla 31 **Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	440,339 ^a	5	88,068	34,302	,000
Intersección	55761,886	1	55761,886	21718,900	,000
Planta	129,650	2	64,825	25,249	,000
Metodo	51,205	1	51,205	19,944	,001
Planta * Metodo	259,484	2	129,742	50,534	,000
Error	30,809	12	2,567		
Total	56233,034	18			
Total corregida	471,148	17			

a. R cuadrado = ,935 (R cuadrado corregida = ,907)

PRUEBAS POST HOC

Planta

Tabla 32 Respuesta datos análisis planta tendencia.

	Planta	N	Subconjunto	
			1	2
DHS de Tukey ^{a,b}	2,00	6	53,4971	
	1,00	6	54,0375	
	3,00	6		59,4413
	Sig.		,831	1,000
Scheffe ^{a,b}	2,00	6	53,4971	
	1,00	6	54,0375	
	3,00	6		59,4413
	Sig.		,845	1,000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 2,567.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000

b. Alfa = ,05.

Se cumplieron todos los supuestos de la estadística paramétrica como se evidencia en la gráfica de residuales presentada y en la prueba de Levene

Se encontraron diferencias significativas después de aplicar una prueba de ANOVA a un diseño factorial, se encontró que la interacción de la planta con el método de extracción tiene un efecto combinado en la respuesta $p < 0,05$, lo que permite rechazar la hipótesis nula y definir que estas dos variables interactúan en la respuesta.

Dado que se presentó significancia en la interacción, se definió que la planta 1 y 3 se comportan de manera similar bajo el método de extracción dos, cuando el método de extracción cambia la respuesta a nivel antioxidante es mejor para la planta 3 acorde con la gráfica de medias presentada (Plantas 1- *Gnaphalium pellitum*, 2 - *Achyrocline satureioides* y 3- *Conyza bonariensis*)

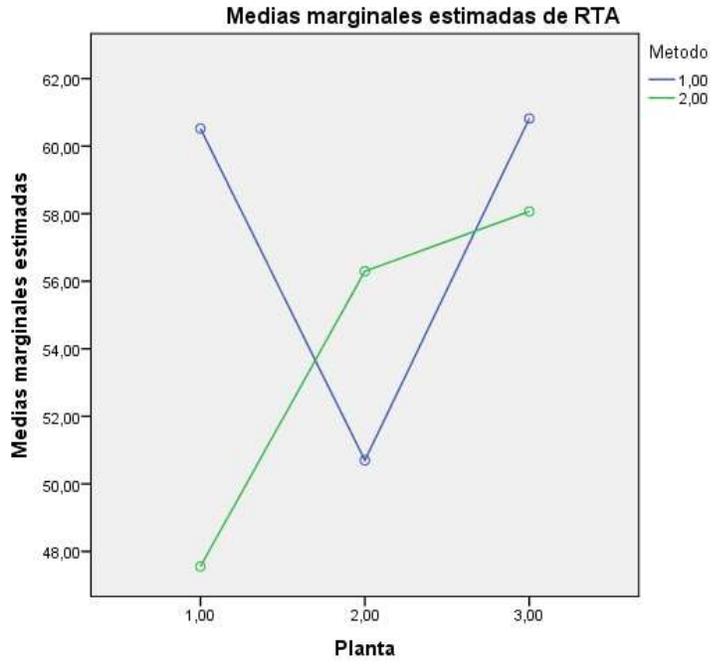


Fig 42 Medidas marginales plantas 2.

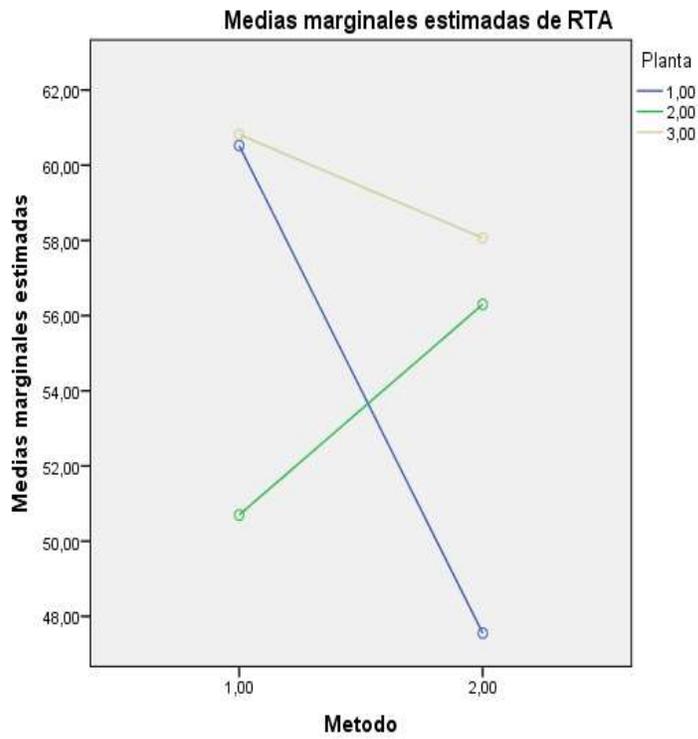


Fig 43 Medidas marginales método 2.

4.5 Actividad antibacteriana.

Se evaluó la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de hojas obtenidos por ambos métodos de acuerdo al numeral 2.6 frente a dos tipos de bacterias gram positivas como: *Staphylococcus aureus* ATCC 6535 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984; mientras que para las bacterias gram negativas se eligieron tres tipos de bacterias: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027 y *Proteus mirabilis* ATCC 29906; observándose halos de inhibición (actividad positiva), (fig 24) por parte de los aceites esenciales frente a bacterias gram positivas datos mostrados en la tabla 33. El ensayo se efectuó por duplicado.

Tabla 33. C 50 de los aceites de las hojas

	<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	<i>Pseudomona aeruginosa</i> (-)	<i>Proteus mirabilis</i> (-)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (+)	<i>Escherichia coli</i> (-)
	C50	C50	C50	C50	C50
<i>Conyza bonariensis</i> AV	312,52	211,37	-	213,32	213,32
<i>Conyza bonariensis</i> HD	236,85	-	-	162,07	162,07
<i>Gnaphalium pellitum</i> AV	560,48	-	-	-	-
<i>Gnaphalium pellitum</i> HD	803,25	-	-	-	-
<i>Achyrocline satureioides</i> AV	752,69	-	392,07	464,98	464,98
<i>Achyrocline satureioides</i> HD	423,41	-	1.136,66	-	-

Posteriormente se realizaron cálculos para obtener los ABR (Actividad Bacteriana Relativa) de los aceites de las tres plantas estudiadas. (Tabla 34)

Tabla 34. ABR de los aceites de las hojas

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>
	ABR	ABR	ABR	ABR	ABR
<i>Conyza bonariensis</i> AV	8,35	19,61	-	11,24	10,15
<i>Conyza bonariensis</i> HD	6,33	-	-	8,54	7,71
<i>Gnaphalium pellitum</i> AV	14,97	-	-	-	-
<i>Gnaphalium pellitum</i> HD	21,45	-	-	-	-
<i>Achyrocline satureioides</i> AV	20,10	-	24,34	24,50	22,12
<i>Achyrocline satureioides</i> HD	11,31	-	70,57	-	-

Tabla 35. mg de los aceites que presentan actividad

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>
	mg	mg	mg	mg	mg
<i>Conyza bonariensis</i> AV	0,18	0,37	-	0,26	0,26
<i>Conyza bonariensis</i> HD	0,08	-	-	0,24	0,24
<i>Gnaphalium pellitum</i> AV	0,02	-	-	-	-
<i>Gnaphalium pellitum</i> HD	0,42	-	-	-	-
<i>Achyrocline satureioides</i> AV	0,10	-	0,22	0,10	0,10
<i>Achyrocline satureioides</i> HD	0,04	-	0,80	-	-

Los aceites esenciales extraídos de *Conyza bonariensis*, *Gnaphalium pellitum* y *Achyrocline satureioides*, presentaron actividad antibacteriana frente a bacterias gram negativas y gram positivas.

El aceite *Achyrocline satureioides* obtenido por arrastre por vapor inhibe el crecimiento de las bacterias gram negativas como *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis* y *Escherichia coli*

Los aceites de *Conyza bonariensis* obtenidos por las dos técnicas inhiben el crecimiento de *Staphylococcus epidermidis* y *Escherichia coli*

El aceite de *Achyrocline satureioides* obtenido por hidrodestilación solo inhibe el crecimiento de *Proteus mirabilis*

Los aceites *Gnaphalium pellitum* obtenidos por los dos métodos no inhiben ninguna bacteria gram negativa.

Los aceites de *Conyza bonariensis*, *Gnaphalium pellitum* y *Achyrocline satureioides* obtenidos por las dos técnicas inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus*

El aceite de *Conyza bonariensis* obtenido por arrastre de vapor solo inhibe el crecimiento de *Pseudomona aeruginosa*.

Estos resultados están relacionados con la diversidad y abundancia de metabolitos que integran cada aceite.

5 CONCLUSIONES

1. Se logró extraer los aceites esenciales de hojas de las especies *Conyza bonariensis*, *Gnaphalium pellitum* y *Achyrocline satureioides*, por las técnicas de hidrodestilación (HD), Arrastre por vapor (AV). Así mismo se identificaron los componentes de los aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y comparación con las bibliotecas NIST 8,0 y WILEY 8.0.
2. Se cuantificaron los compuestos presentes en los aceites esenciales de las hojas, para la *G. pellitum* por el método de extracción HD, encontrando que los compuestos mayoritarios son (*C bonariensis* HD con [16.00% Hexadecanoato de etilo, 10,52%, tetradecanoato de 2-propilo, 9,30%, Hexadecanoato de metilo, 7,42%, 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona] *C. bonariensis* AV, [18.50%Globulol, 8.19% (z) 7-Hexadecenal. 6.75% Epiglobulol, 5,44% viridiflorol.], *G. pellitum* HD [11.88% (Alfa-bisabolol, 5.32% 3-ciclopentil-1-(2,4-dimetilfenil)-1-propanona, 3.71% oxido de cariofileno]. *G. pellitum* AV [13.11% (3e,6e,10e)-3,7,11,15-tetrametil-1,3,6,10,14-hexadecapenteno , 9.06% Cariofileno, 7.90% 2,3,4,4a,5,6,7,8-octahidro-. α , α .,4a,8-tetrametil-[2r-(2. α .,4a. β ,8. β .)]2-naftalenmetanol.], *A. satureioides* HD [8.16% 3,3,6,6-Tetrametoxi-1,4-ciclohexadieno, 6.84% 4,4a,5,6,7,8-hexahidro-2(3H)-Naftalenona, 6.09% hexacosano], *A. satureioides* AV [11,07% Triacotano, 8.45% 6,10,14-trimetil 2-Pentadecanona, 8.17% Hexatriacontano).
3. En las extracciones de los aceites esenciales, por ambas técnicas, se obtuvieron porcentajes de rendimiento para hojas en fresco del 0,35% al 0,59%, aproximadamente, rendimientos buenos en comparación con los reportados para plantas aromáticas comerciales como la manzanilla, la canela y la hierbabuena. Resultados que toman importancia relevante para la comercialización y aplicaciones futuras del aceite esencial y de la planta, teniendo en cuenta que el material vegetal utilizado en el trabajo es colectado de plantas no de cultivo.
4. Los aceites esenciales extraídos de *Conyza bonariensis*, *Gnaphalium pellitum* y *Achyrocline satureioides*, presentaron actividad antioxidante baja con respecto al ácido ascórbico por el radical DPPH^{*}, con un $(1/ (IC_{50} \text{ muestra})) / (1/ (IC_{50} \text{ patron}))$ * 100 entre 1,3% y 3,0%, destacándose la *G pellitum*.

5. Actividad es generada por sustancias con capacidad de ceder protones, como compuestos de tipo fenólicos, los cuales no fueron identificados en los aceites esenciales estudiados. (ver tablas 7 a 12).

6. Los aceites de *Gnaphalium pellitum*, *Achyrocline satureioides* y *Conyza bonariensis*, por las técnicas de hidrodestilación (HD) y arrastre por vapor (AV), presentaron Actividad Antibacteriana Relativa (ABR) frente a *Staphylococcus áureus* respecto a la Rifaximina de 21,45% y 14,97%; 11,31% y 20,10%; 6,33% y 8,35% respectivamente. A excepción de los aceites de *G. pellitum* (HD), (AV) y *A. satureioides* (HD) los otros aceites presentaron actividad frente a *Escherichia coli*, destacándose el aceite de *C. bonariensis* (HD) y (AV). ABR de 22,12% y *C. bonariensis* (AV) con un ABR de 10,15%. *C. bonariensis* (AV) frente a *Pseudomona aeruginosa* de 19,61% . *A. satureioides* (HD y AV) frente a *Proteus mirabilis* 70.57% y 24.34%.

6 PERPECTIVAS Y APLICACIONES.

Los aceites esenciales extraídos de hojas de las asteráceas presentan actividad antioxidante para lo cual se deben realizar más ensayos en su aplicación como antitumoral y antiangiogénica, por tanto es importante verificar esta actividad en el aceite esencial, o evaluar si el mismo puede constituir una fuente adecuada para obtener el compuesto.

Es necesario estudiar los aceites esenciales del tronco y ramas de estas plantas debido a que también presentan olor, por tanto puede haber presencia importante de los aceites y tal vez la probabilidad de un mayor rendimiento.

La *Conyza bonariensis* presentó actividad frente a bacterias gran positivas y gran negativas lo que lleva a realizar estudios más profundos sobre su posible aplicación, ya que antibióticos de amplio espectro son escasos.

Es necesario comparar los extractos de hojas de *Gnaphalium pellitum*, *Achyrocline satureioides* y *Conyza bonariensis* por otros métodos de obtención, para observar si hay un mejor rendimiento y si afecta en cuanto a pérdida de volátiles.

Para posteriores trabajos relacionados con los aceites esenciales es conveniente realizar el estudio de los índices de retención tanto en columnas polares como apolares, ya que estos acercan aún más los datos proporcionados a los componentes del aceite en estudio.

7 BIBLIOGRAFIA.

- Alarcón García Ingrid Johana, Hernandez Cruz Diana Cristina, 2013, Evaluación de la actividad antioxidante y citotóxica en hojas e inflorescencia de *gnaphalium meridanum* (*gnaphalium* cf. *polycephalum* michx. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A grupo de investigación de productos naturales pronaudca bogotá d.c. 2013 pg 1-94
- Albarracin M. Gloria, Gallo P, Sonia G. 2005. Comparación de los métodos de extracción de aceite esencial utilizando *piper aduncum* (cordoncillo) procedente de la zona cafetera. Universidad Nacional de Colombia, Manizales. Colombia.
- Alvarez Q. Rafael M. 2012, Formulación de un recubrimiento comestible para frutas cítricas, estudios de su impacto mediante aproximación metabólica y evaluación de la calidad poscosecha. Universidad de Antioquia. Colombia.
- Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P., 2006. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4364–4370.
- Antolovich, M. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, v. 127, p.183- 198,
- Araujo, L., Moujir, L. M., Rojas, J., Rojas, L., Carmona, J., & Rondon, M. (2013). Chemical composition and biological activity of *Conyza bonariensis* essential oil collected in Merida, Venezuela. *Natural product communications*, 8(8), 1175-1178.
- Arredondo M.F , Blasina F , Echeverry C , Morquio A , Ferreira M , Abin-Carriquiry J.A , Lafon L , Dajas F , 2004, Citoprotección por *Achyrocline satureioides* (Lam) DC y algunos de sus principales flavonoides contra el estrés oxidativo., *Journal of Ethnopharmacology* Volume 91, Issue 1, March 2004, Pages 13–20
- Arteta B M C., 2008. Etnobotanica de plantas vasculares en el Centro Poblado Llançhón, Distrito Capachica. Depto Puno, Arequipa Peru.
- Avello, Marcia, & Suwalsky, Mario. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, (494), 161-172. Recuperado en 31 de mayo de 2014, de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-04622006000200010&lng=es&tlng=es. 10.4067/S0718-4622006000200010.
- Bandoni, A. et al. 2000. “Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica”. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata, La Plata - Argentina.
- Baxendale, PM, Jacobs, HS, James, VHT. Salivary testosterone: relationship to unbound plasma testosterone in normal and hyperandrogenic women. *Clinical Endocrinology*. 1982;16:595–603.
- Bettega J; Texeirah M.R., Bassani V. L, Barardi C.R. Simoes (2004)“Evaluation of the Antiherpetic Activity of Standardized Extracts of *Achyrocline satureioides*” *Phytother. Res* 18, 819-823.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie/Food Science and Technology*, 28: 25-30
- Calderón E, Cogollo A, Velásquez C, Serna M, Garcia N. 2007. Libro rojo de las plantas de Colombia, Volumen 5: Las Magnoliáceas, las Miristicáceas y las Podocarpáceas. Serie libros rojos de especies amenazadas de Colombia. Instituto Alexander Von Humbolt, Bogotá, Colombia. 9-12.
- Calderon, MI, Abud, M; Vega, IA; Castro-V, A; Giraud-Billoud, M, 2012. Mecanismos de defensa antioxidante durante la isquemia/reperfusión en un invertebrado dulceacuícola. Mendoza. Argentina.
- Calvo, D., Cariddi, L. N., Grosso, M., Demo, M. S., & Maldonado, A. M. (2006). *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC (Marcela): antimicrobial activity on *Staphylococcus* spp. and immunomodulating effects on human lymphocytes. *Rev. Latinoam. Microbiol*, 48, 247-255.
- Callacondo-Riva David, Quispe-Mauricio Angel, Lindo-Gamarra Selamir, Vaisberg Abraham J. 2008, Actividad citotóxica del extracto etanólico de *gnaphalium spicatum* keto keto” en cultivos de líneas celulares tumorales humanas, *Rev. perú. med. exp. salud publica* v.25 n.4
- Cardenas D., Politis G. 2000, Territorio, movilidad, y manejo del bosque de los Nukak orientales. Amazonia colombiana. Estudios Antropológicos No3. Ediciones Uniandes. Bogotá, Colombia.
- Carrizo, E. D. V., Palacio, M. O., & Roic, L. D. (2002). Plantas de uso medicinal en la flora de los alrededores de la ciudad de Santiago del Estero (Argentina). *Dominguezia*, 18(1), 26-35.
- Cerpa. M. G., 2007. Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización. Universidad de Valladolid, departamento de ingeniería química y tecnología del medio ambiente Valladolid. España.
- Dabbah, R., V.M. Edwards y W.A. Motas., Antimicrobial Activity of Some Citrus. Fruits Oils on Selected Food- Borne Bacteria. *Appl. Microbiology*. 1970. 19 (1): 27-31.
- Farga C. Lastra J. 1988. Plantas de uso común en Chile. Tomo I. Santiago. SOPRAMI. 119 p.
- García Barriga H, 1975, Flora Medicinal de Colombia. Botánica Médica, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Tomo III, pp . 296-297.
- Garcia, Eugenio José, Oldoni, Tatiane Luiza Cadorin, Alencar, Severino Matias de, Reis, Alessandra, Loguercio, Alessandro D., & Grande, Rosa Helena Miranda. (2012). Antioxidant activity by DPPH assay of potential solutions to be applied on bleached teeth. *Brazilian Dental Journal*, 23(1), 22-27. Retrieved April 20, 2015, from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-64402012000100004&lng=en&tlng=en. 10.1590/S0103-64402012000100004.
- Garquez, Mirtha.(1998). Acido araquidónico y radicales libres: su relación con el proceso inflamatorio. *Rev Cubana Invest Biomed* 14.

- Gattuso, S, J; Gattuso, Marta A. 1998, Caracteres anatómicos y exomorfológicos distintivos de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. *Departamento de Ciencias Biológicas, Especialidad Botánica. Área Biología Vegetal. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Suipacha Acta Farm. Bonaerense* 17:255-261..
- Giangualani, R.A. 1976. Las especies argentinas del genero *Achyrocline* (Compositae). *Darwiniana* 20: 549- 576.
- González P., D. J.; "Utilización Terapéutica de Nuestras Plantas Medicinales", Universidad de La Salle, Bogotá, 1984, Capítulo VI. Citado por MARTÍNEZ, A; Aceites esenciales, facultad de química farmacéutica, Medellín, febrero 2003.{en línea} {12 de diciembre de 2011) disponible en (<http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf>).
- Granados M. Ronald M. ; Arias J. Wilmer A. 2007. Diseño de una planta extractora de aceites esenciales por arrastre con vapor. Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga. Colombia.
- Guerrero. A., Panizo G y López MC.. 2000, Actividades Antioxidante y Fotoprotectora de la Secreción de *Cryptomphalus aspersa* (Principio Activo de Endocare), industria farmacéutica. CANTABRIA S.A.
- Guerrero López, Angélica (2012) *Evaluación de aceites esenciales de lippia organoides en el control de hongos fitopatógenos (fusarium sp., y colletotrichum sp.) en el cultivo de ají cayena capsicum annum.* Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. - Disponible: <http://www.bdigital.unal.edu.co/>
- Heiden, G., Barbieri, R.L., Wasun, R.A., Scur, L., Sartori, M., 2007. A familia Asteraceae em Sao Mateus do Sul, Parana. *Revista Brasileira de Biociencias* 5, 249–251.
- Hernández, Mesa, Mauro. Plantas colombianas, su aplicación medicinal, biblioteca banco popular, Bogotá, 1992.
- Kadarian C. , Broussalis A.M. , Miño J. , Lopez P. , Gorzalczany S. , Ferraro G. , Acevedo C. , 2002, Actividad hepatoprotectora de *Achyrocline satureioides* (Lam) DC, *Pharmacological Research*, Volume 45, Issue 1, January 2002, Pages 57–61
- Kartal, N., M. Sokmen, B. Tepe, D. Daferera, M. Polissiou and A. Sokmen, 2007. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chem.*, 100: 584-589.
- Katinas, L., D. Gutiérrez, M. A. Grossi & J. V. Crisci. 2007. Panorama de la familia Asteaceae Compositae) en la República Argentina. *Bol. Soc.Argent. Bot* 42 (1-2): 113-129.
- Koneman E. 1999. *Diagnostico Microbiológico*. Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Labuckas, d.o, Maestri d.m., Grosso n. r., Zygaddlo J.A. , (1999) "Essencial oils of *Achyrocline satureioides* and *Achyrocline alata* and *Achyrocline tormentosa*" *planta Medica* 65 184-186 [www. Tropicos.org/conyza bonariesis/Achyrocline saturaeioides/ Gnaphalium pellitum](http://www.Tropicos.org/conyza_bonariesis/Achyrocline_saturaeioides/Gnaphalium_pellitum).

-Lamarque, A; Zygadlo, J; labuckas, D; López, L; Torres, M; Maestri, D.2008. Fundamentos teórico-práctico de Química orgánica. Editorial Encuentro. Argentina. P 38-40.

-Lizcano Andrea, Vergara Jenny. 2008. 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 los organismos patógenos y fitopatógenos. Carrera de microbiología Industrial. Facultad de ciencias básicas. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de grado. Bogotá D.C, Pg 1-20.

-López Valencia, Juan P. 2008. Estandarización de la técnica de cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de metilesteres de ácidos. Tesis Maestría. Universidad Tecnológica de Pereira. Risaralda. Colombia.

-López, Paula G., Broussalis, Adriana M., Rodríguez, María G. Coussio, Jorge Daniel Ferraro, Graciela Ester 1996, Análisis de muestras comerciales de "marcela" (*Achyrocline satureioides*), : Acta Farmacéutica Bonaerense; vol. 15, no. 4 p. 243-249

-Lorian, V. (1996). *Antibiotics in laboratory medicine*. 4th ed. Baltimore

-Luján MC, Pérez Corral C.2008. Cribado para evaluar actividad antibacteriana y antimicótica en plantas utilizadas en medicina popular de Argentina. Rev Cubana Farm. 2008 may.-ago.;p 42 .

-Manzano Santana Patricia, Miranda Migdalia, Gutiérrez Yamilet z, García Gastón, Orellana Tulio, Orellana-Manzano Andrea. 2011, Efecto antiinflamatorio y antimicótico del extracto alcohólico y composición química del aceite de hojas de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (canilla de venado), Rev Cubana Plant Med v.16 n.1 Ciudad de la Habana, P 13-23.- Martínez, A; Aceites esenciales, facultad de química farmacéutica, Medellín, febrero 2003. {en línea} {12 de diciembre de 2011} disponible en (<http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf>).

-Martinez Gustavo J. 2005 Recolección y comercialización de plantas medicinales en el departamento Santa María, Provincia de Córdoba, Argentina

-Martínez Jairo René, Stashenko Elena, Castañeda Martha I., Muñoz, 2007, Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas., *Scientia et Technica*, ISSN 0122-1701, Vol. 1, Nº. 33, 2007, págs. 165-166

-Martino V. S, Ferraro G. E, Debenedetti S. L, Coussio J.D. 1989 Determinación Espectrofotométrica del contenido de Acido Cafeoilquínicos en especies Argentinas de compuestos usados en medicina popular. Buenos Aires Argentina.

-Masotti, V., Juteau, F., Bessie`re, J.M., Viano, J., 2003. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7115–7121.

-Milli D Austin. (2000), *The Healing Bath: Using Essential Oil Therapy to Balance Body Energy*. Vermont, USA., p 135-136.

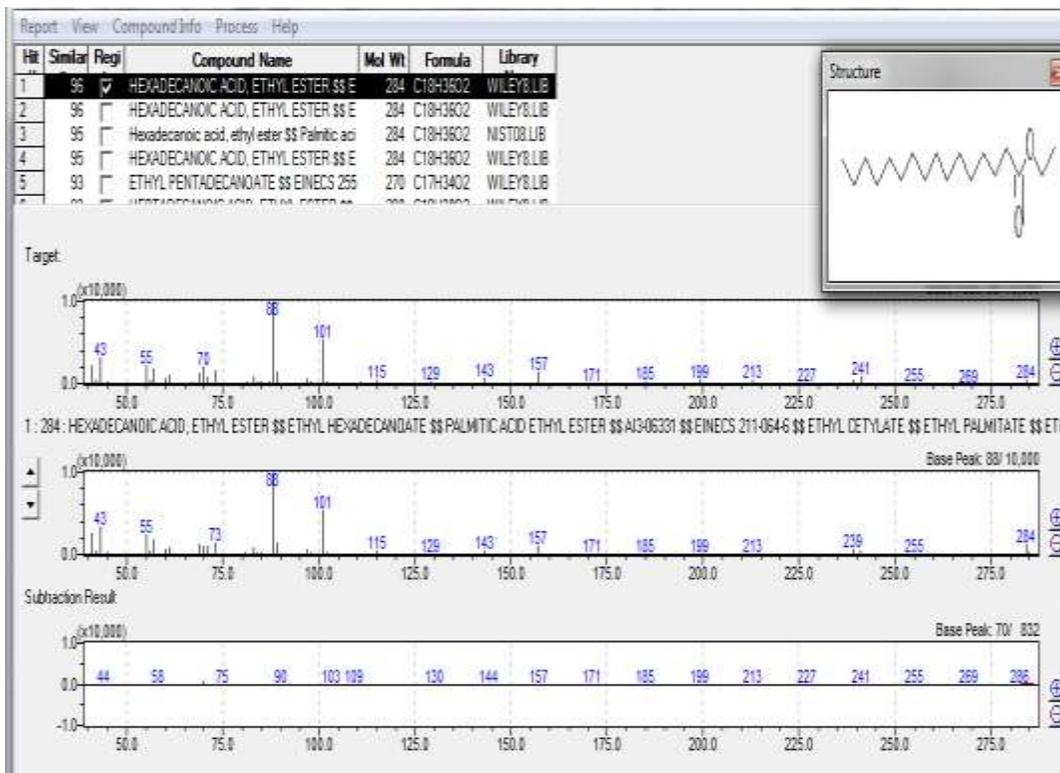
- Millones F. Carlos. 2009. Radicales Libres de Oxígeno y el uso de Antioxidantes en el ejercicio Forzado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.
- Mondragon, P.J, 2004 . URL, Heike vibrans, 16 Agosto 2009, Malezas de Mexico, 22 de Nov 2011.
- Morales de Godoy, 1996. V. Extracción y Caracterización del aceite esencial de Lima Tahití *Citrus aurantiifolia* (Chritms) Swingle. Maracaibo, Venezuela, p. p 18-19. Trabajo especial de Grado. Facultad Experimental de Ciencias.
- Nesom G. 1990. Taxonomy of *Achyrocline* (Asteraceae: Inuleae) in Mexico and Central America. *Phytologia* 68: 181-185.
- Olivera Simões Claudia Maria,, Schenke Eloir Paulo , Bauer Luis , Langeloh Augusto , 1988, Investigaciones farmacológicas en *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC . , Compositae. *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 22, Issue 3, April 1988, Pages 281–293
- Ortiz Luis, Bonilla Mauro. 2009. Paramos en Colombia: un ecosistema vulnerable. Observatorio. Grupo de estudios en economía política y medio ambiente. Universidad Sergio Arboleda. Bogotá Pg 1-10.
- Padilla, F. C; Rincon, A. M; Bou-Rached, L. 2008 .Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *ALAN*, Caracas, Venezuela. v. 58, n. 3.
- Papa, J. C. (2002). Malezas tolerantes y resistentes a herbicidas. Actas del Seminario Sustentabilidad de la Producción Agrícola. INTA, JICA, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires.
- Pino. N., Martínez. L., Stashenko, E.; 2008. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *S. conica* y *S. guianensis* especies de la Familia Monimiaceae. *REVISTA SALUD UIS*, Vol 40, No 2
- Pinto-Zarate, J.H, Rangel-Ch, O, 2010. La vegetación de los paramos del norte de Colombia (Sierra Nevada de Santa Marta, Serrania del Perija): Colombia diversidad biótica X: Cambio global (natural) y climático (antrópico) en el páramo colombiano. 289–410. Bogotá: Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia.
- Polydoroa, M de Souzaab K.C.B, Andradesa M.E, Da Silvaa E.G, Bonattoa F, Heydrichb J, Dal-Pizzola F, E.E. Schapovalb S, Bassanib V.L, J.C.F, 2004, Antioxidante, un pro- oxidante y citotóxicos efectos de los extractos *Achyrocline satureioides*. *Life Sciences* Volume 74, Issue 23, 23 April 2004, Pages 2815–2826
- Portilla. A. 1951. Divulgación de conocimientos científicos sobre plantas más útiles y conocidas en Colombia. Su valor alimenticio, medicinal e industrial. Pasto.
- Prior, R., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (10), 4290.
- Rangel, J. 2001. La región paramuna y franja aledaña en Colombia. En: Rangel Ch, J.(ed.). Colombia Diversidad Biótica III. La región de vida paramuna. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.Pp1-23.

- Retta D, Di Leo Lira P, van Baren C, Elechosa M, Juárez M, Molina A, Bandoni A. 2009. "Composición del aceite esencial de las partes aéreas de *Achyrocline satureioides* provenientes de ocho poblaciones del centro de Argentina". En Resúmenes del Primer Congreso Internacional de Farmacobotánica de Chile y Tercera Reunión BLACPMA, Chillán, Chile.
- Rincón Parra Nidia Stella, 2012. Contexto y perspectiva de la red de suministro: Plantas aromáticas en Colombia. Universidad Nacional Abierta y a Distancia – UNAD.
- Romero D, Calvo M, Villarba MP, Amiguet JA, Bueno J. 1987 Radicales libres y especies activadas del oxígeno. Química, biología e implicaciones en patología médica: I. An Med. Intenn; 4: 673-9.
- Rivera, Juliette. 2009 "medicina alternativa: la aromaterapia." {En línea} {12 de diciembre 2014} disponible en. www.remediospopulares.com/Aromaterapia.html.
- Robards. K., Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food Chem. v. 66, p. 401-436
- Rodríguez-Álvarez, M., Alcaráz-Meléndez, L., Real-Cosío, S. 2012. Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. Edit. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, Baja California Sur, México. p38.
- Rzedowski, Graciela y Rezedowski Jerzy. 2003 Flora de Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 112, Instituto de ecología-Centro Regional de Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
- Secretaría Técnica de los Organismos Nacionales de Ciencia y Tecnología de los países del convenio Andrés Bello (2003). Datos presentados en la Conferencia internacional de bosques: "Colombia: País de Bosques y vida". Santa Marta, noviembre 18-20.
- Smith, P.A., J. Stewart y L. Fyfe. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Letters in Applied Microbiology. 1998. 26 (2): pp.118-122.
- Sequeda, G. 2008. Actividad antioxidante de extractos totales y fracciones de la especie vegetal *Anacardium exelsum* (Bert, Balb. Ex Kunth) Skeel por métodos espectrofotométricos y composición de la fracción activa por CG-EM. Tesis de maestría, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Stashenko, E.; En: Memorias del IV Congreso Nacional de Fitoquímica, Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química, Bucaramanga, febrero de 1996, pp. 29-53. Citado por Martínez, A; Aceites esenciales, facultad de química farmacéutica, Medellín, febrero 2003. {en línea} {12 de diciembre de 2014} disponible en <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001.pdf>
- Torrenegra Ruben, Pedrozo Julio, Robles Jorge Waibela Reiner, Achenbach Hans, 2001, Diterpenes from *Gnaphalium pellitum* and *Gnaphalium graveolens*, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia
- Torres, F, Leyva M, A, 2007. Estudio de las características del aceite esencial de *Cabrieriella oppositicordia* (asterácea), Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

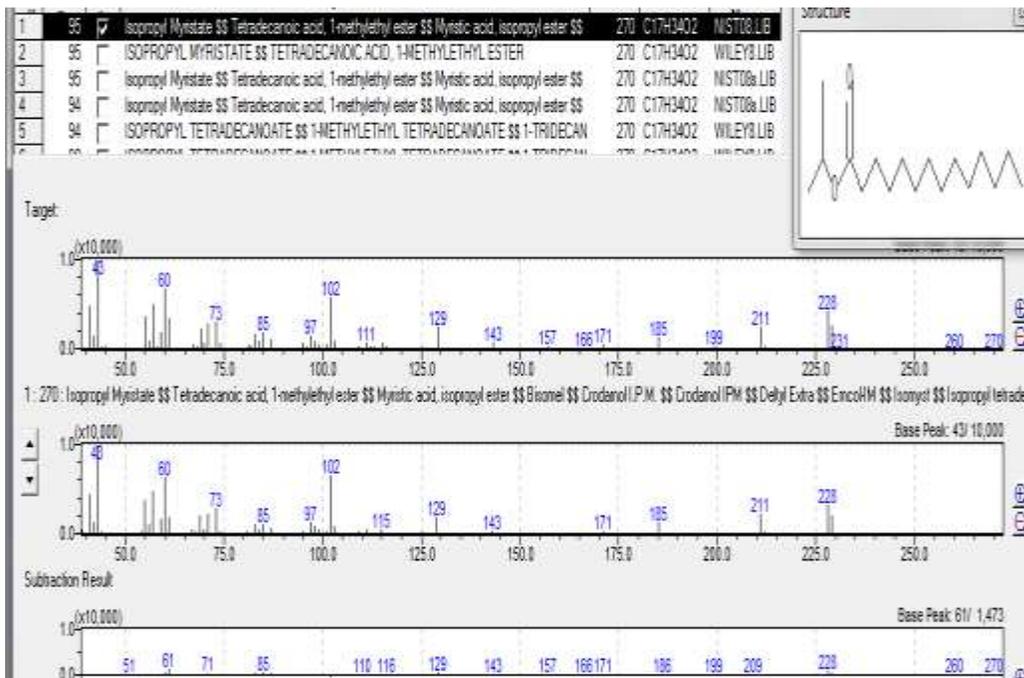
- Ugartondo C, Vanessa, 2009. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Facultad de farmacia. Universidad de Barcelona. Tesis de Doctorado. Barcelona , España.
- Vargas, Franklin; Rivas, Carlos; Nursamaa, Abdoel; Zoltan, Tamara.2007. Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela. Revista Avances en Química, vol. 2, núm. 2, pp. 3-15.
- Vásquez, M. R. S., Vásquez, K. S., & Bringas, A. S 2014. Metabolitos secundarios y efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroetanólico de las flores de *Cantua buxifolia* Juss. ex Lam.(Polemoniaceae)“Flor Sagrada de los Incas”.
- Watson, L.; Dallwitz, M. J.. 2007. Compositae. *The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Version: 1st June*, DELTA database (Dallwitz 1980; Dallwitz, Paine, and Zurcher 1993). It comprises an interactive system for identification and information retrieval using the program Intkey (Dallwitz, Paine, and Zurcher 1995, 2000)
- Wee Sim Choo; Wee Khing Yong ., 2011 Antioxidant properties of two species of *Hyloceraus* fruits. *Advances in Applied Science Research*;Jun2011, Vol. 2 Issue 3, p 418.
- Yen GC, Duh PD (1994). Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free radical and active oxygen species. *Food Chem.*,42: 629-632.
- Zapata Bibiana , Durán Camilo , Stashenko Elena , Betancur-Galvis Liliana , Mesa-Arango Ana Cecilia, 2010, Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae, *Revista Iberoamericana de Micología*, Volume 27, Issue 2, April–June 2010, Pages 101–103.
- Zamora, Fr. Alonso de (1635). *Historia de la Provincia de San Antonino del Nuevo Reino de Granada*. Barcelona –España.
- Zentella de Piña, Martha, Saldaña B, Yolanda. 1996. Papel fisiológico de los radicales libres. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México.

ANEXOS I ESPECTROS ACEITES ESENCIALES

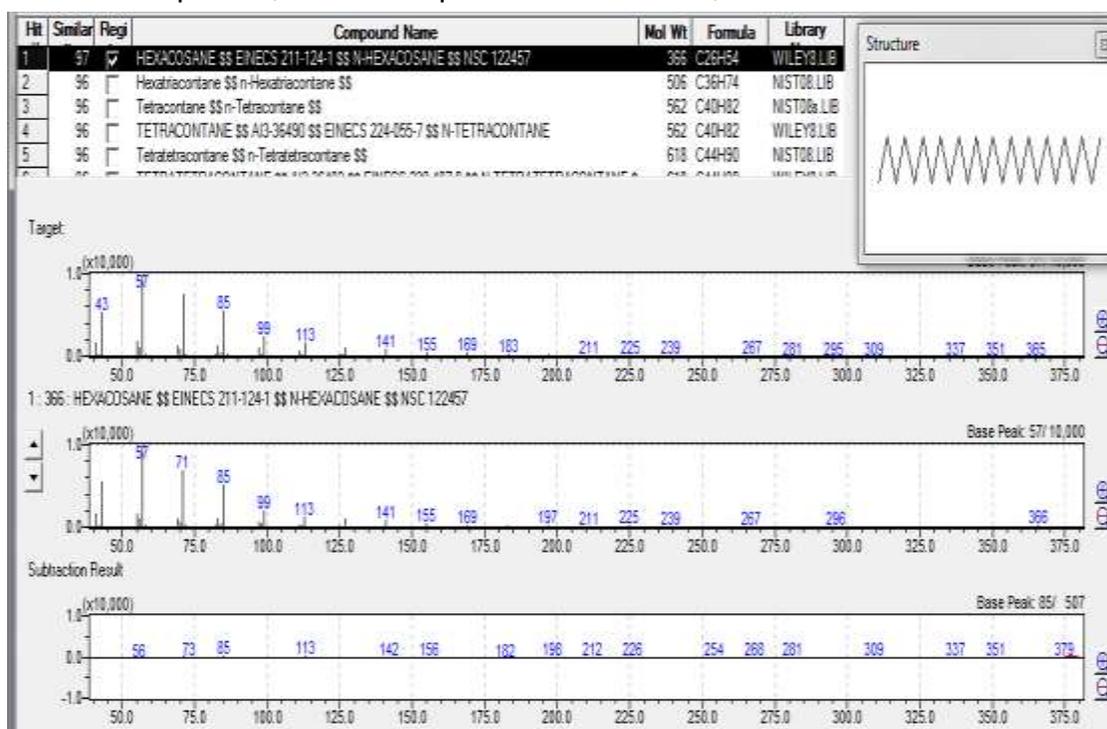
A. Espectros *Conyza bonariensis* hidrodestilación.



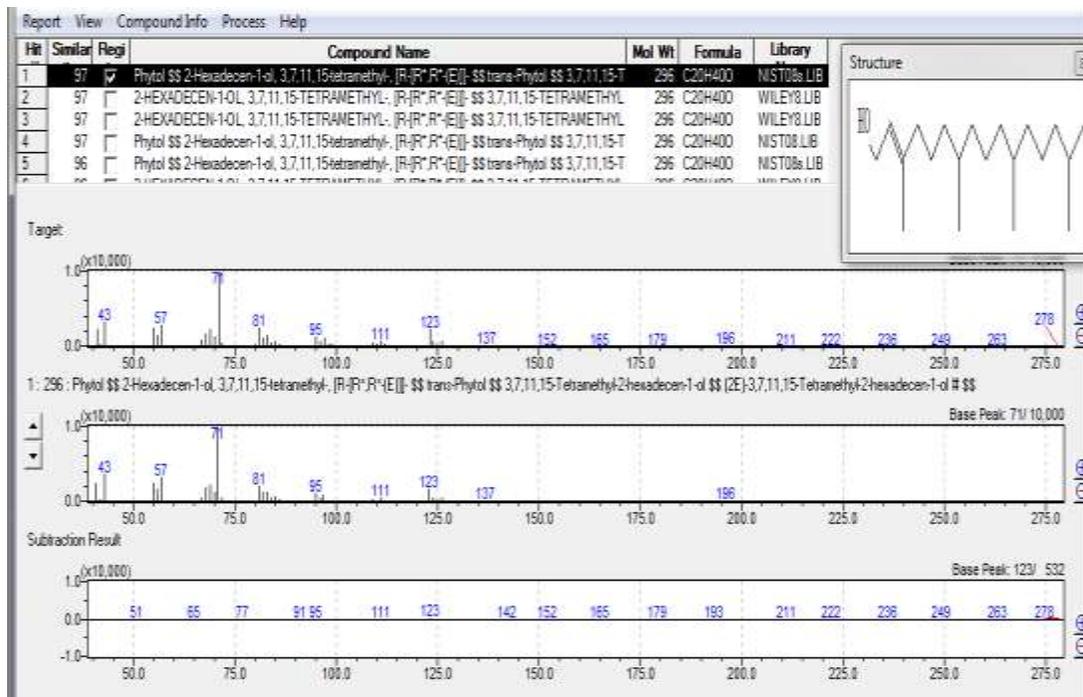
% Área Del pico. 16,00. Tiempo de retención. 48,469 min.



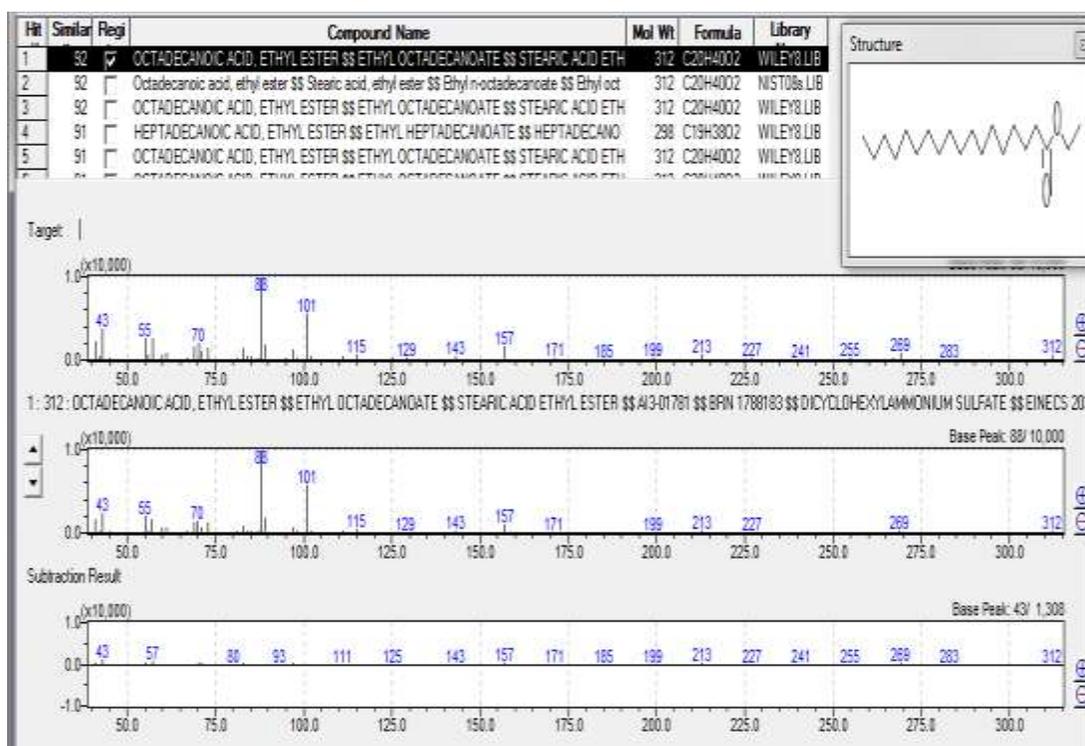
% Área Del pico. 7,24 . Tiempo de retención. 43,366 Min.



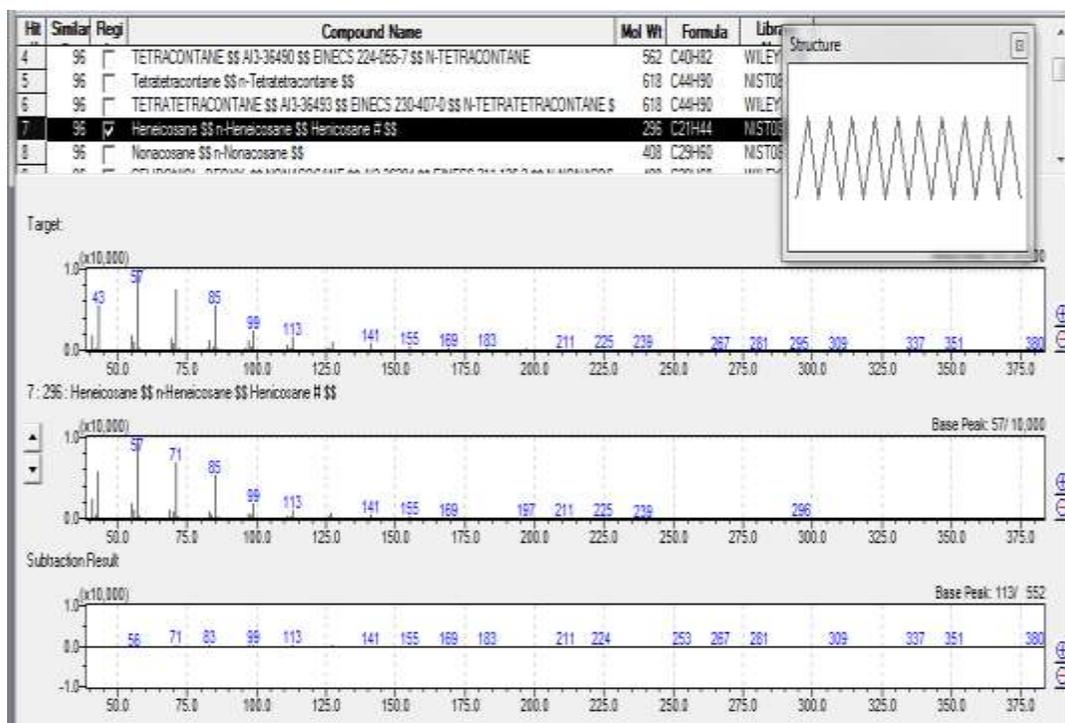
% Área Del pico. 4,75 . Tiempo de retención. 68,320 min.



% Área Del pico. 2,50 . Tiempo de retención. 52,407 min.

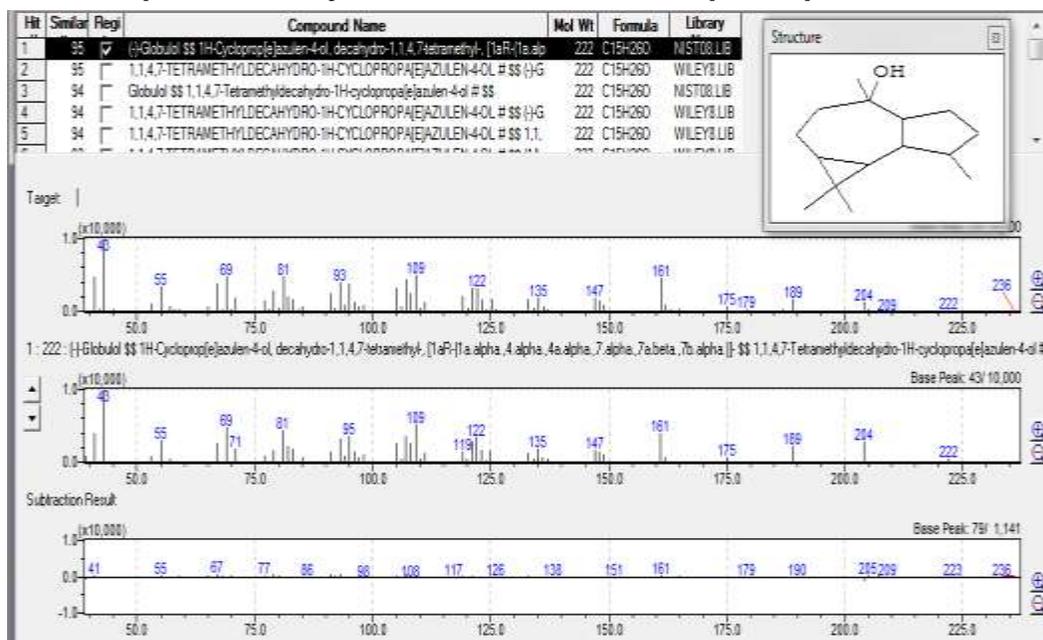


% Área Del pico. 2,12. Tiempo de retención. 55,128 min.

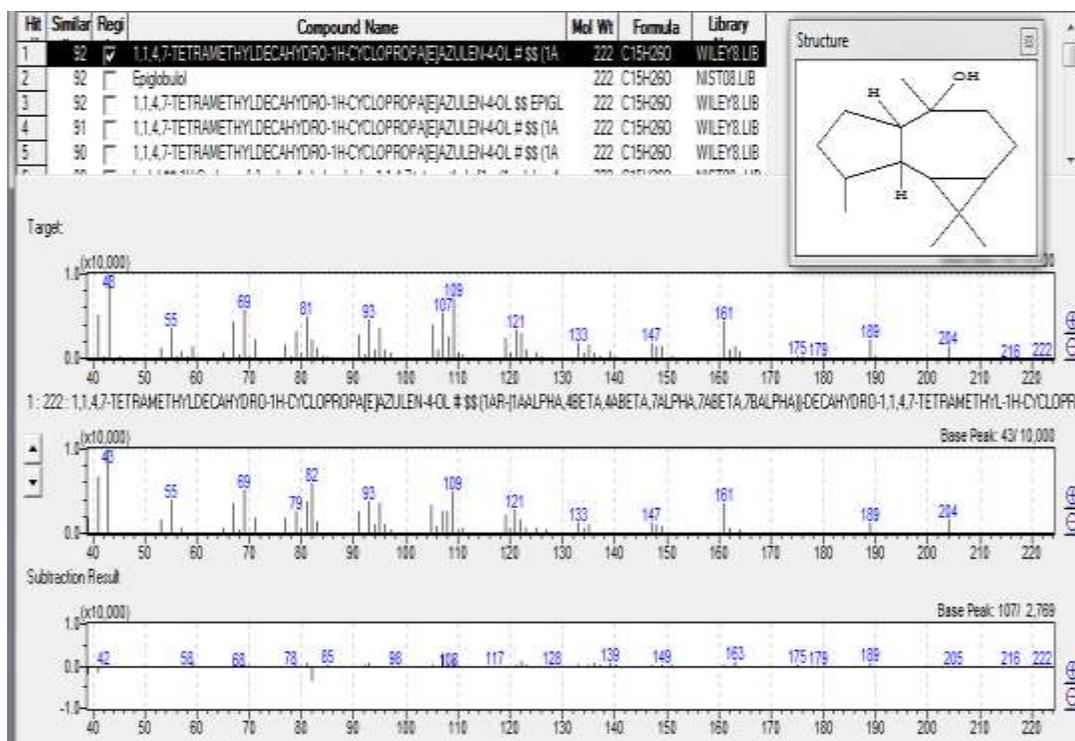


% Área Del pico. 2,13 . Tiempo de retención. 65,888 min.

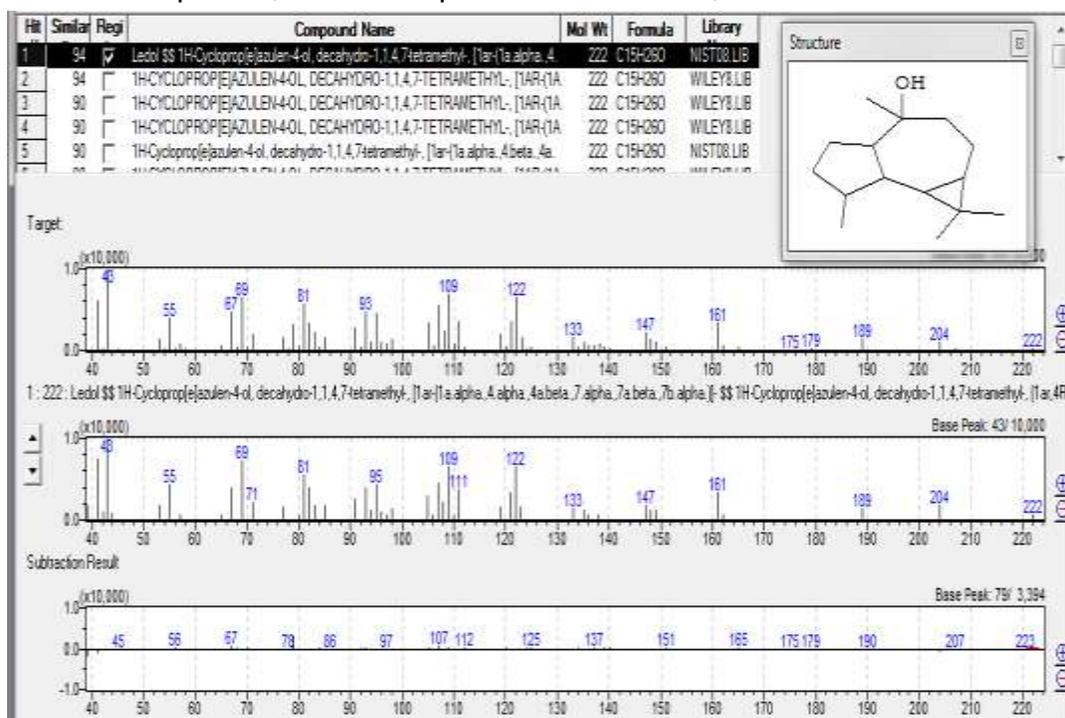
B. Espectros *Conyza bonariensis* Arrastre por vapor.



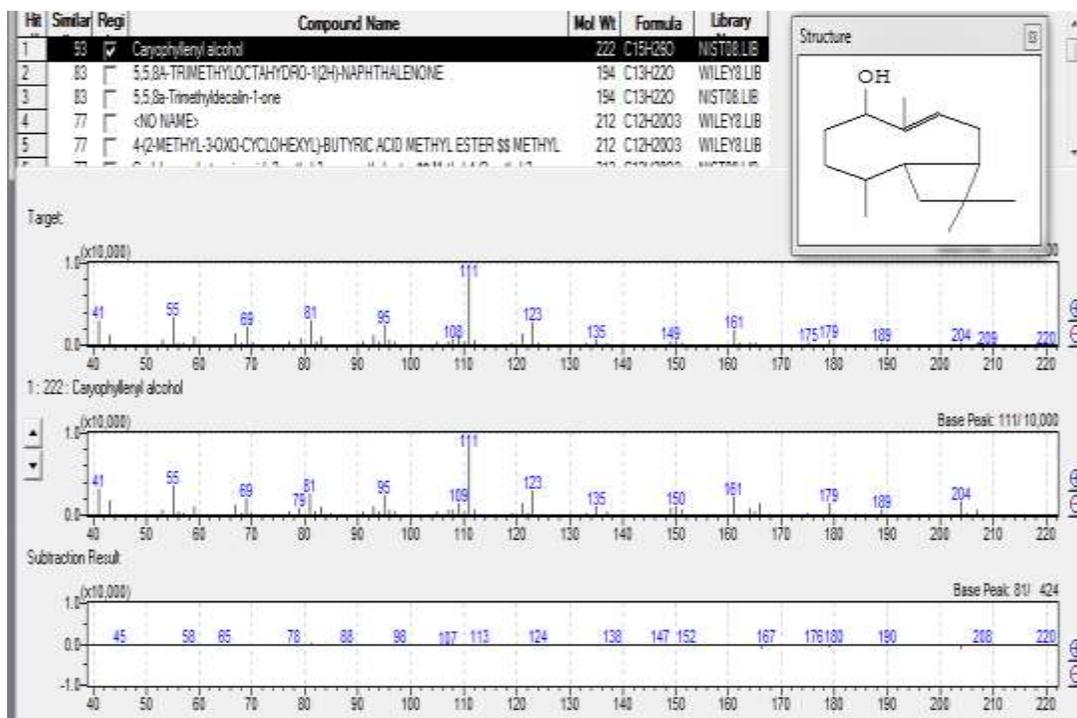
% Área Del pico. 18,50 . Tiempo de retención. 35,352 min.



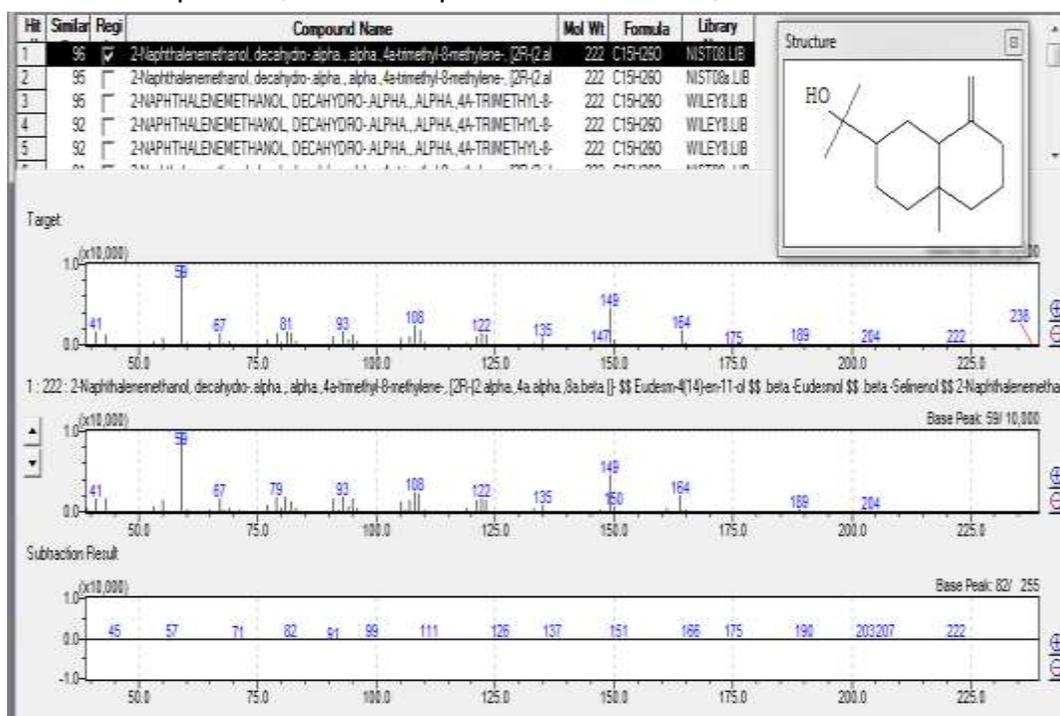
% Área Del pico. 6,75 . Tiempo de retención. 35,561 Min.



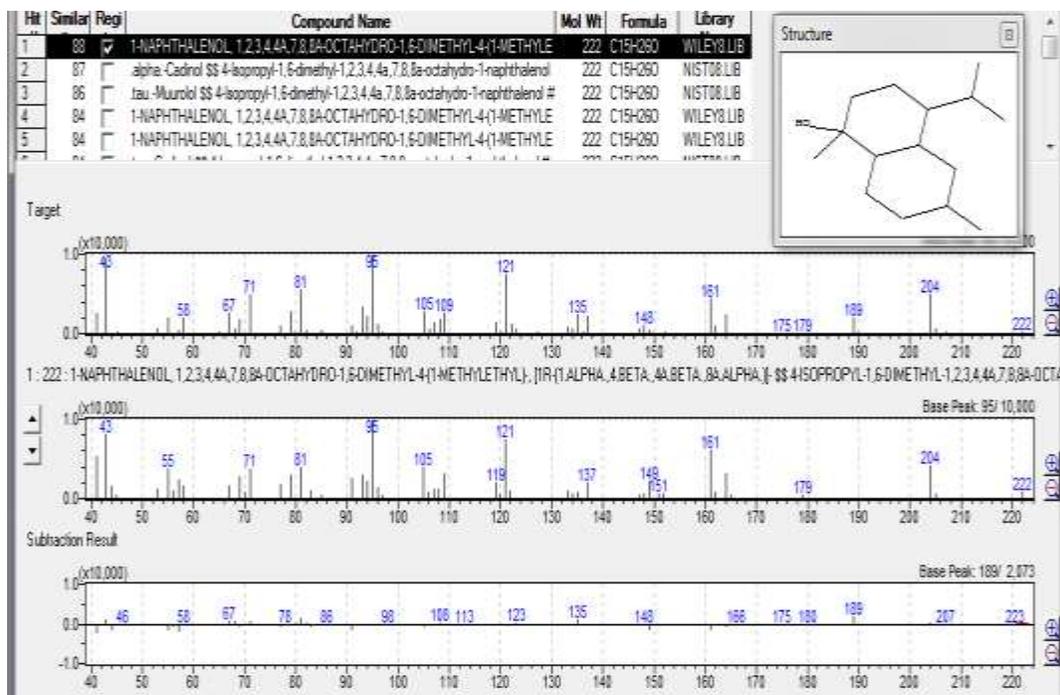
% Área Del pico. 5,44 Tiempo de retención. 35,882 min.



% Área Del pico. 5,15 . Tiempo de retención. 34,884 min

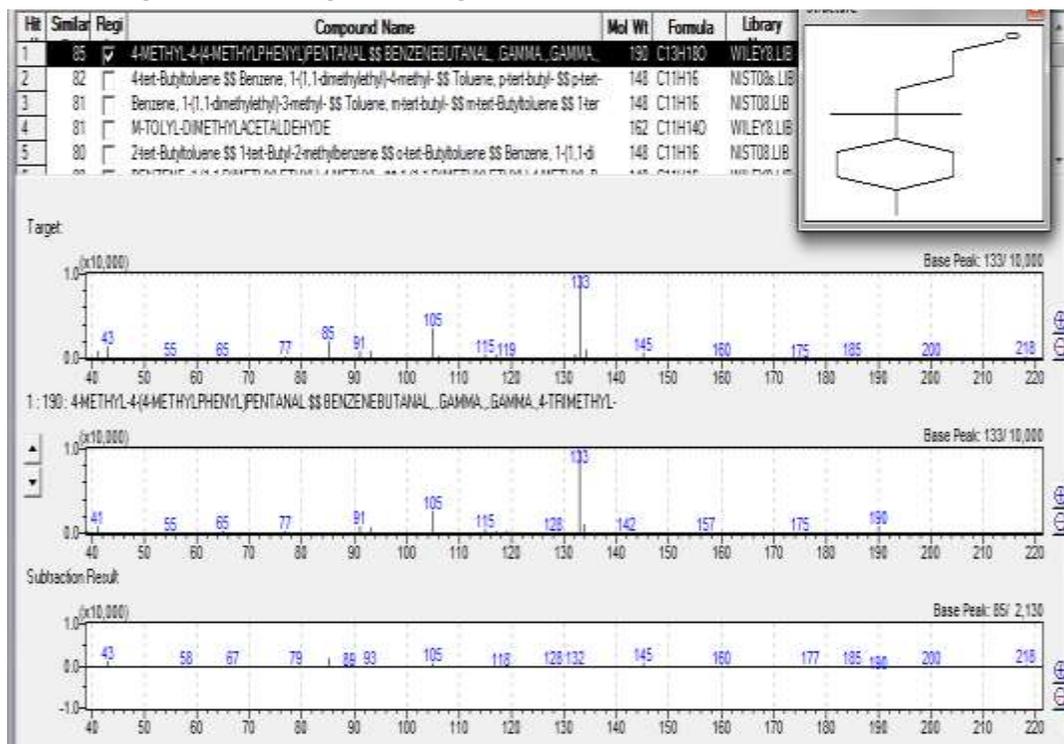


% Área Del pico. 4,70 . Tiempo de retención. 37,290 min.

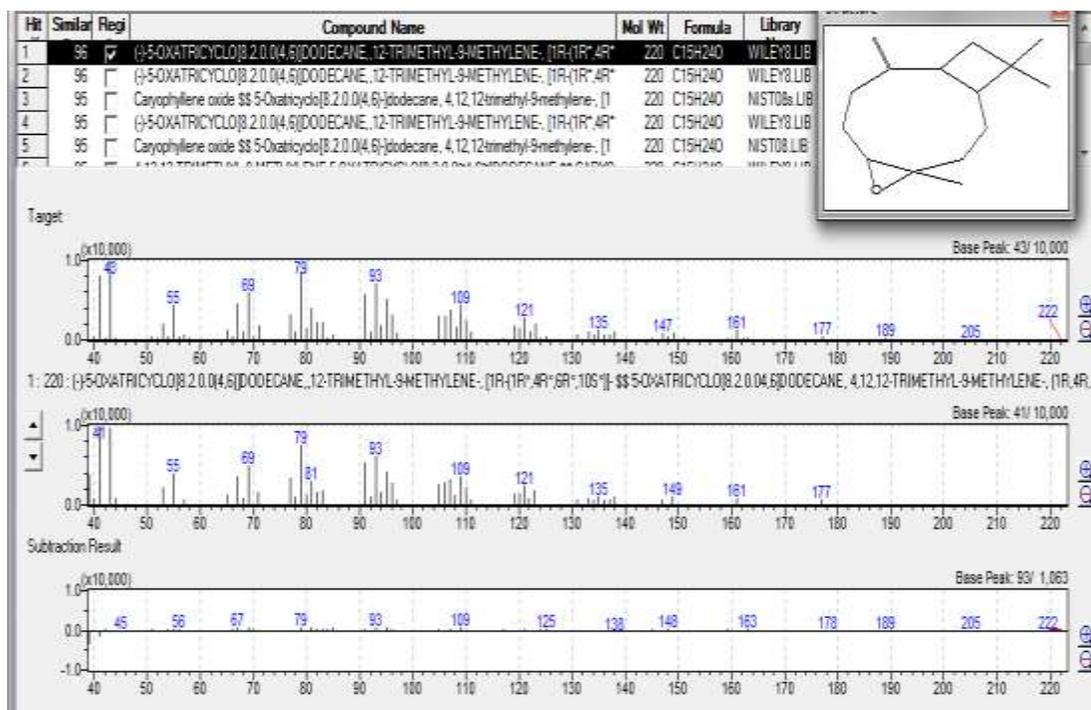


% Área Del pico. 2,60 . Tiempo de retención. 37,408 min.

C. Espectros *Gnaphalium pellitum* hidrodestilación.

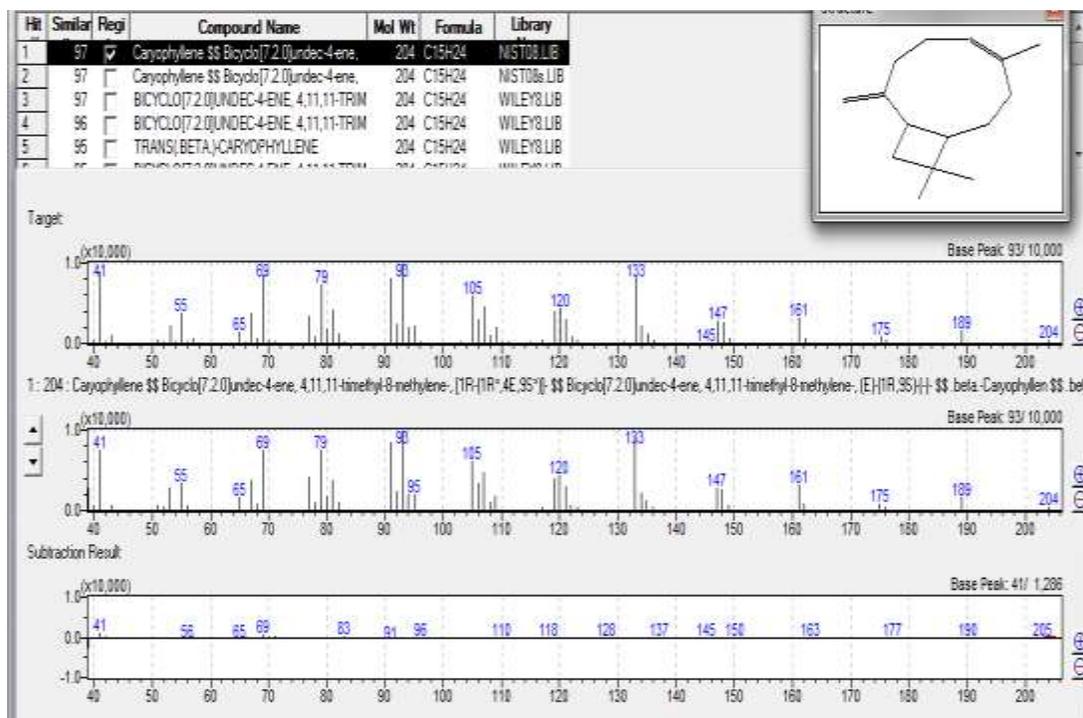


% Área Del pico.5,32. Tiempo de retención. 37,024 min.

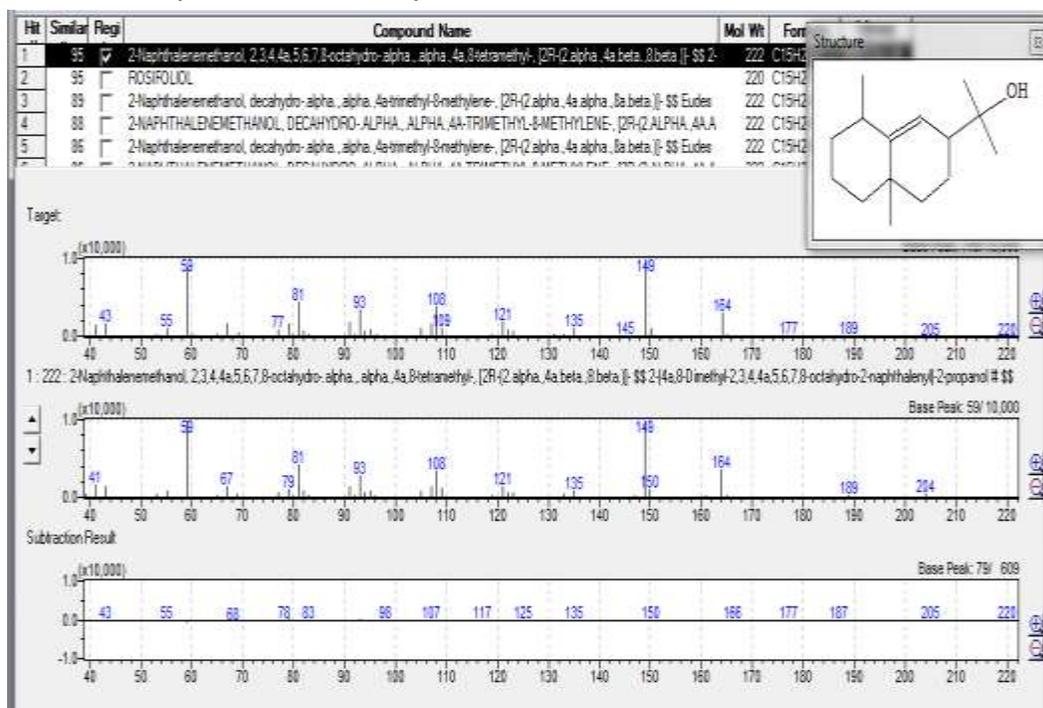


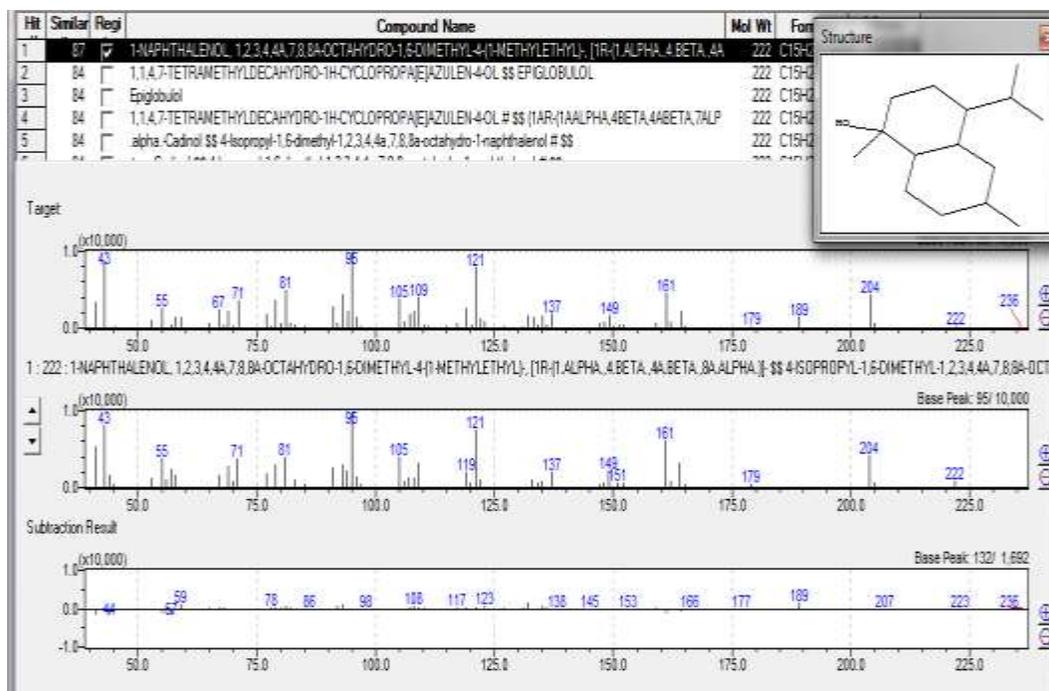
% Área Del pico. 3,71 . Tiempo de retención. 35,312 min.

D. Espectros *Gnaphalium pellitum* Arrastre por vapor.

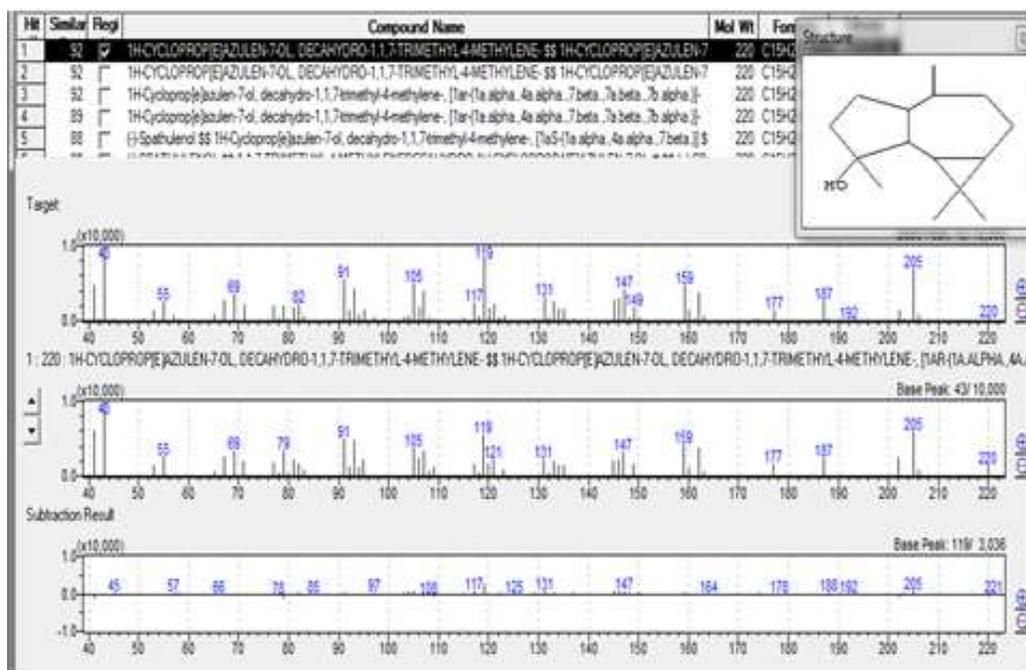


% Área Del pico. 9,06. Tiempo de retención. 30,504 min.

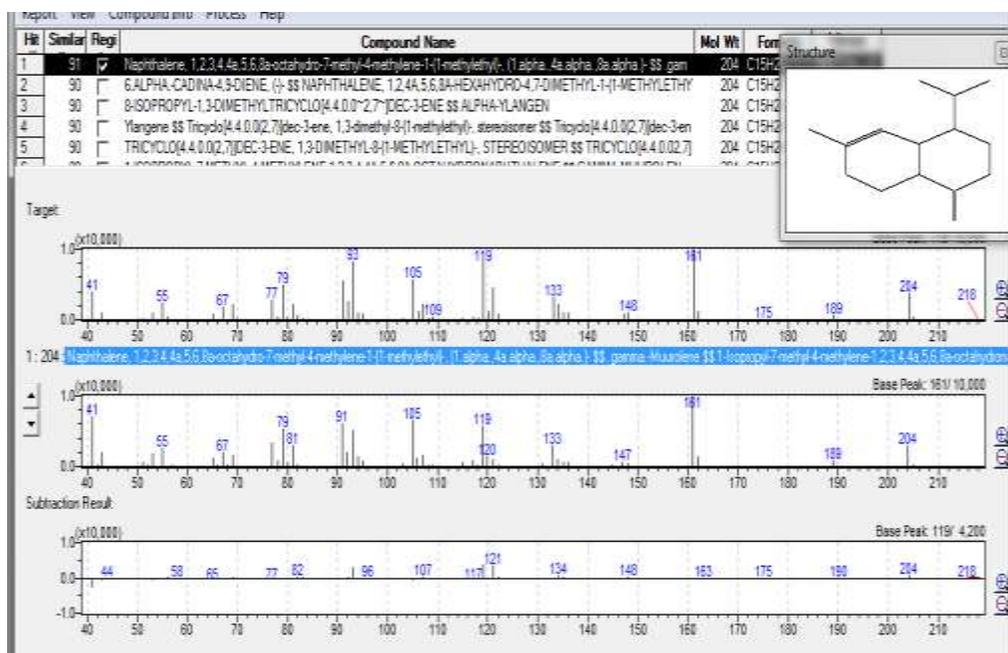




% Área Del pico. 1,37. Tiempo de retención. 37,529 min.

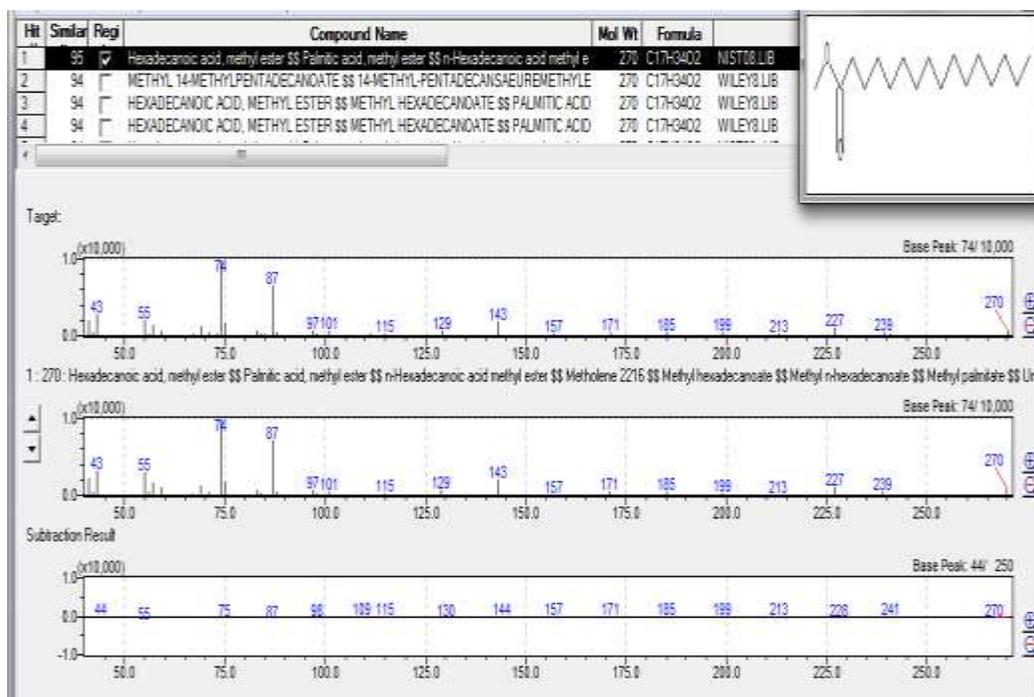


% Área Del pico. 2,70. Tiempo de retención. 35,290 min.

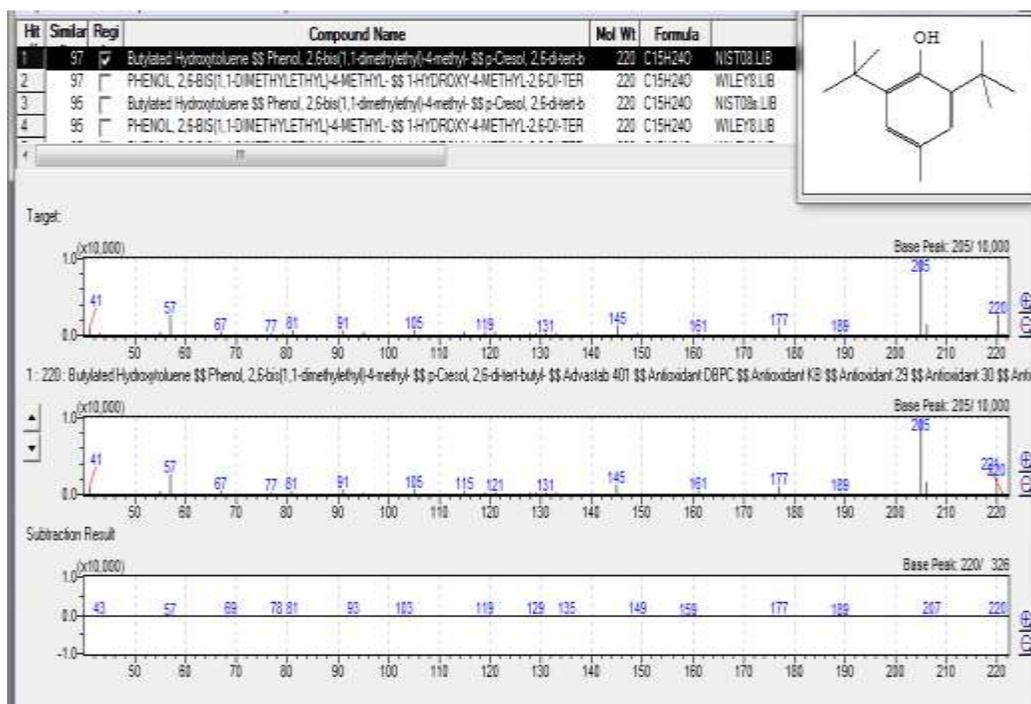


% Área Del pico. 1,63. Tiempo de retención. 32,124 min.

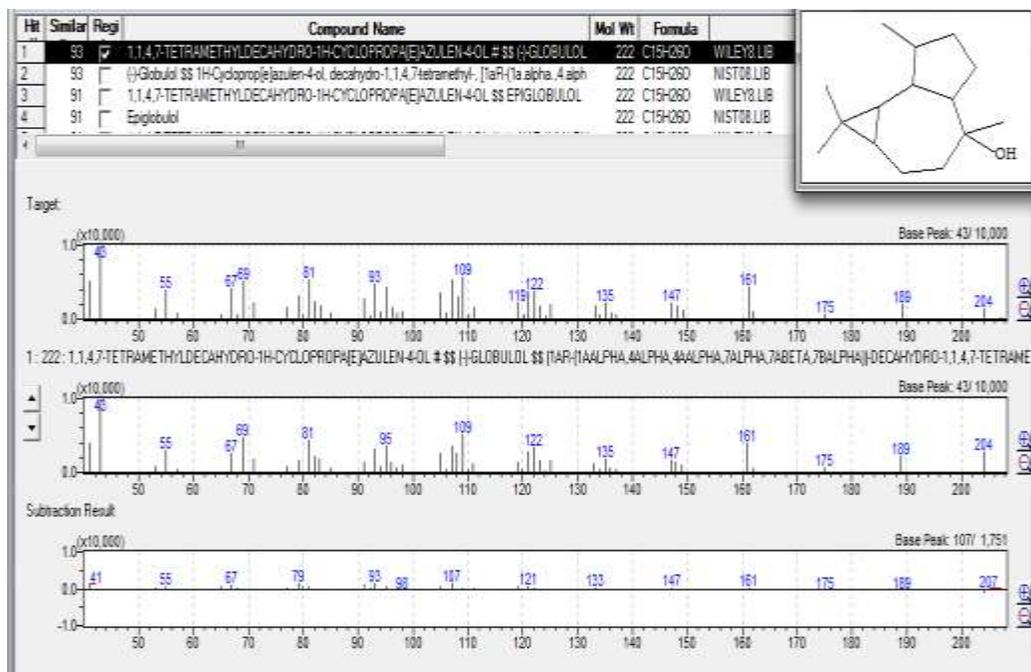
E. Espectros *Achyrocline satureioides* hidrodestilación.



% Área Del pico. 3,85 . Tiempo de retención. 46,072 min.

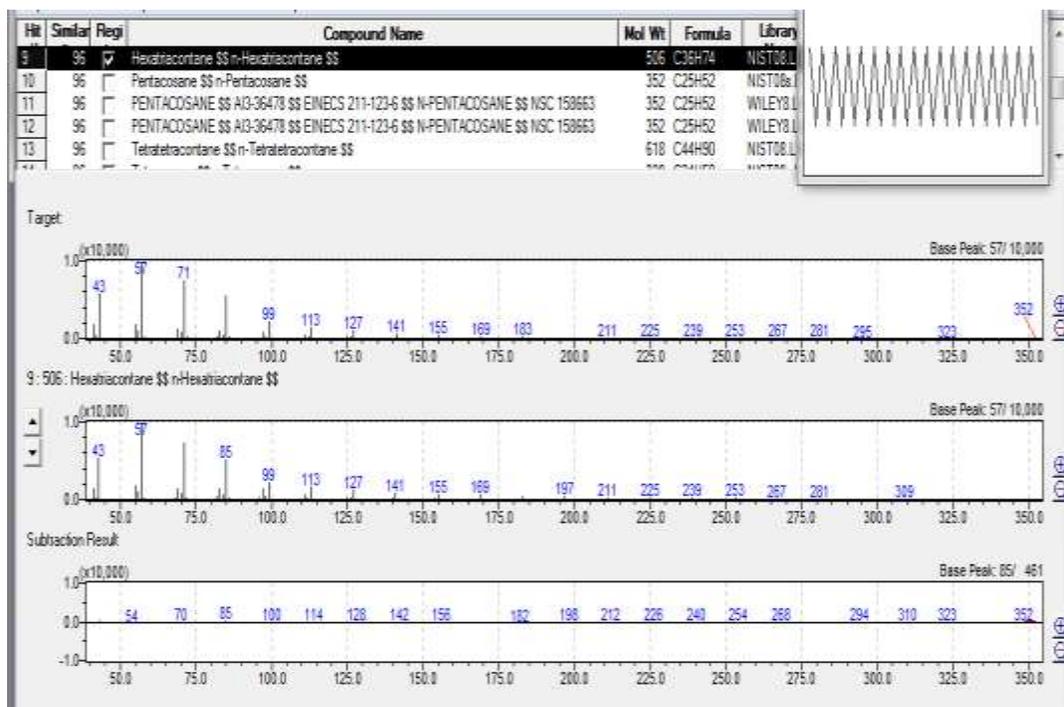


% Área Del pico. 5,58. Tiempo de retención. 33,034 min.

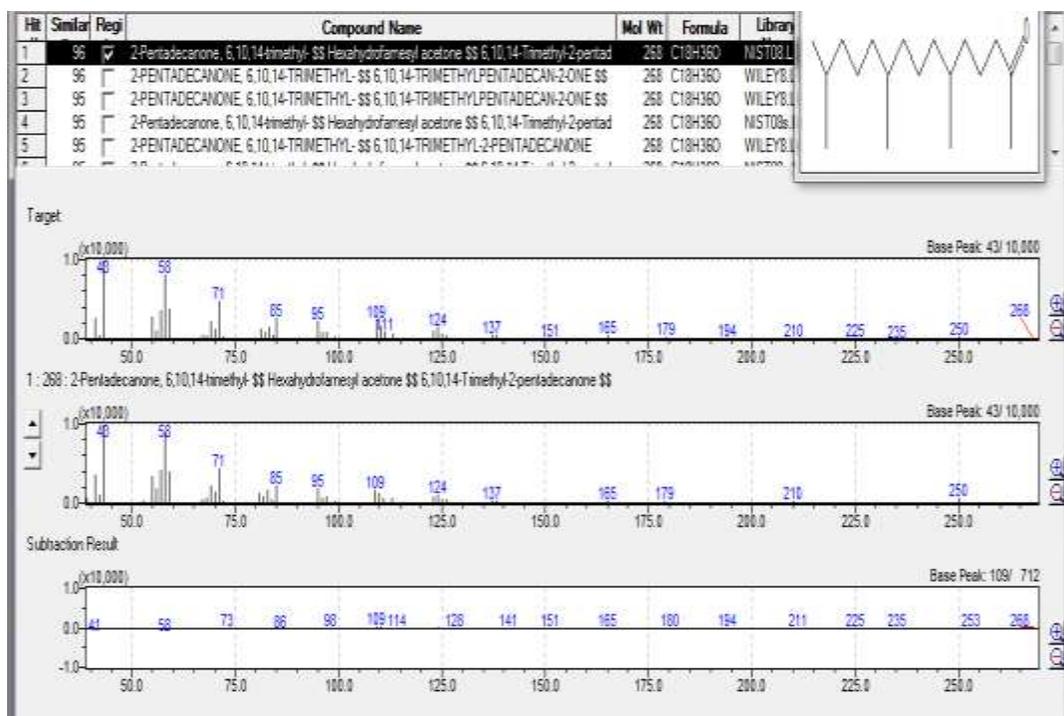


% Área Del pico. 4,34 . Tiempo de retención. 35,221 min.

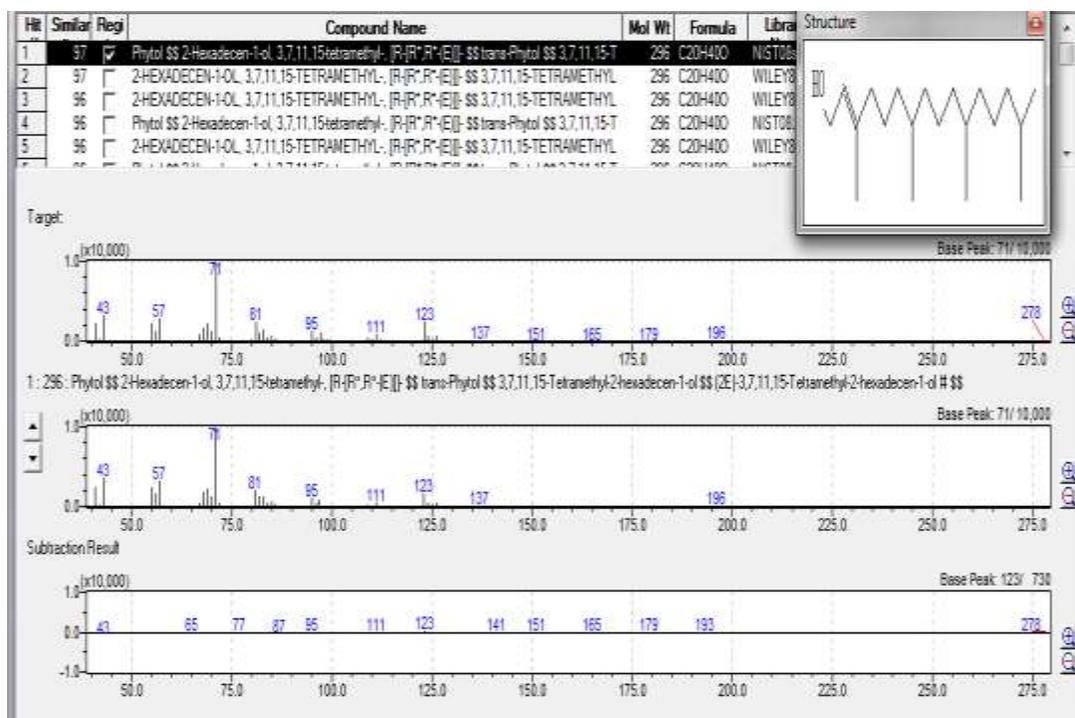
F. Espectros *Achyrocline satureioides* Arrastre por vapor.



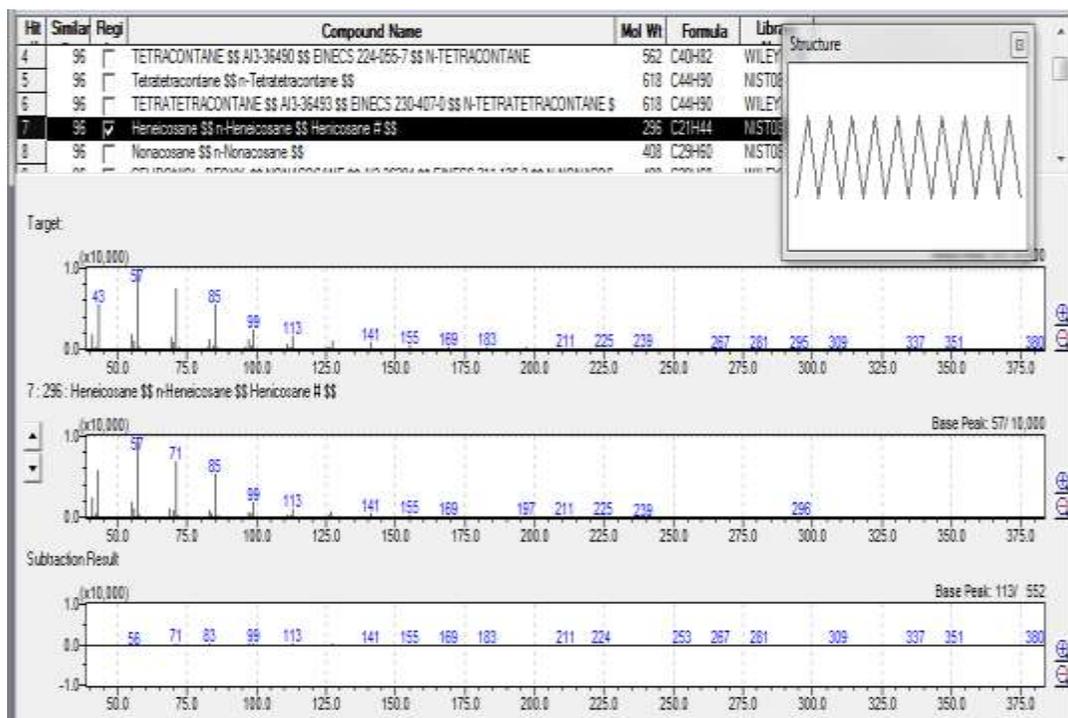
% Área Del pico.8,17 . Tiempo de retención. 68,343 min.



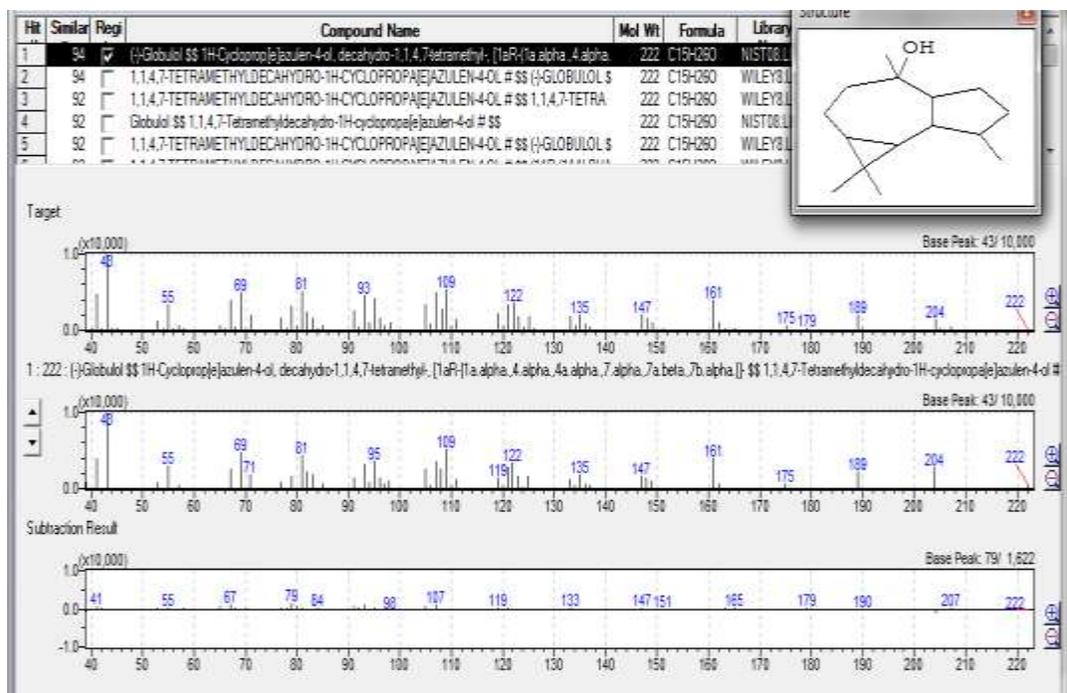
% Área Del pico. 8,45 . Tiempo de retención. 43,390 min.



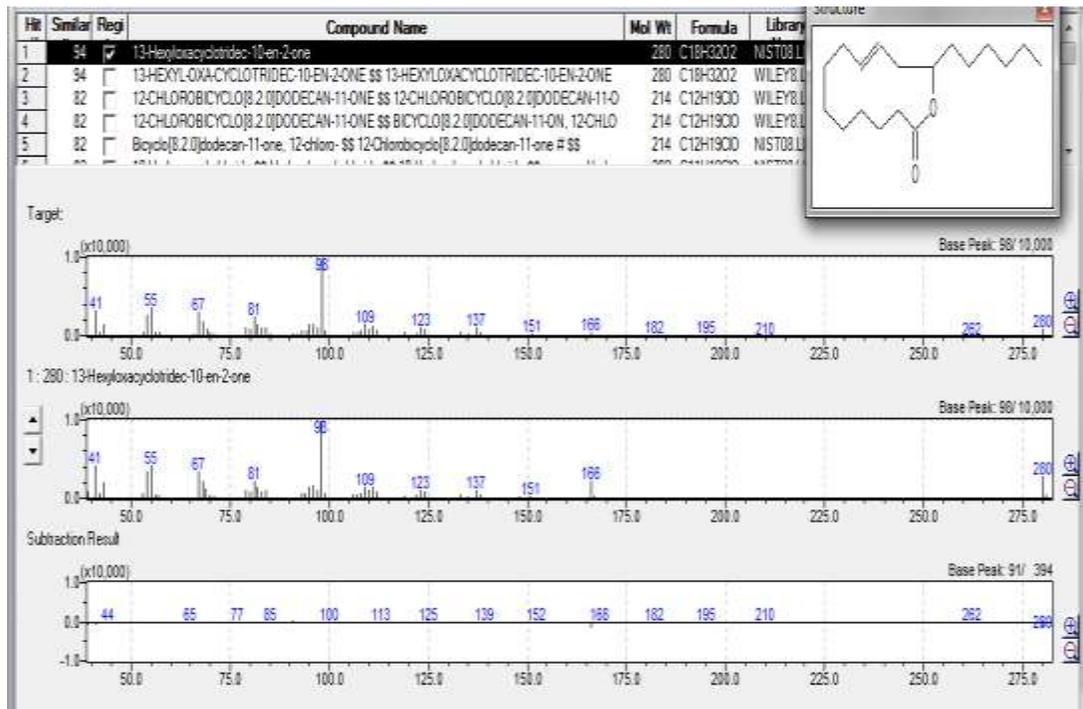
% Área Del pico. 1,62 . Tiempo de retención. 57,531 min.



% Área Del pico. 4,90 . Tiempo de retención. 58,579 min



% Area Del pico. 4,56 . Tiempo de retención. 35,245 min



% Area Del pico. 4,00 . Tiempo de retención. 50,689 min.

ANEXO II Tablas actividad antioxidante por el método DPPH°.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Ácido Ascórbico (patrón).

ANTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACIDO ASCORBICO POR EL MÉTODO DE DPPH°						
tiempo	Abs. a 250 ppm	Abs. a 125 ppm	Abs. a 25 ppm	Abs. a 2,5 ppm	Abs. a 0,25 ppm	Abs. a 0,025 ppm
0	0,84	0,95	0,91	0,904	0,9	0,914
30	0,065	0,071	0,075	0,456	0,627	0,662
60	0,065	0,071	0,073	0,456	0,627	0,662
90	0,064	0,071	0,072	0,456	0,626	0,663
120	0,064	0,07	0,072	0,457	0,626	0,664
150	0,064	0,07	0,072	0,458	0,626	0,667
180	0,064	0,069	0,071	0,459	0,626	0,669
210	0,063	0,069	0,071	0,461	0,625	0,671
240	0,063	0,069	0,071	0,462	0,625	0,673
270	0,063	0,069	0,071	0,463	0,625	0,676
300	0,063	0,069	0,07	0,464	0,625	0,677
330	0,063	0,07	0,07	0,467	0,625	0,679
360	0,063	0,07	0,07	0,468	0,625	0,681
390	0,062	0,07	0,07	0,47	0,626	0,684
420	0,062	0,07	0,07	0,472	0,626	0,685
450	0,062	0,07	0,07	0,473	0,626	0,687
480	0,062	0,07	0,07	0,475	0,626	0,688
510	0,062	0,07	0,07	0,477	0,626	0,69
540	0,062	0,071	0,07	0,478	0,626	0,692
570	0,062	0,071	0,07	0,481	0,626	0,694
600	0,062	0,071	0,07	0,482	0,626	0,696
ERROR RELATIVO	0,389	0,440	0,420	0,211	0,137	0,109
Captación	0,9262	0,9253	0,9231	0,4668	0,3044	0,2385
% captación	92,62	92,53	92,31	46,68	30,44	23,85
log c	2,398	2,097	1,400	0,398	-0,602	-1,602

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE DE <i>Conyza bonariensis</i> (HD)				
Tiempo (seg)	Abs. a 250ppm	Abs. a 125ppm	Abs. a 25ppm	Abs. a 2,5ppm
0	0,856	0,852	0,85	0,864
30	0,536	0,539	0,553	0,627
60	0,519	0,53	0,55	0,624
90	0,504	0,523	0,548	0,623
120	0,494	0,519	0,547	0,623
150	0,489	0,515	0,545	0,622
180	0,484	0,512	0,545	0,622
210	0,48	0,51	0,545	0,622
240	0,476	0,508	0,544	0,622
270	0,472	0,505	0,544	0,623
300	0,469	0,504	0,543	0,624
330	0,465	0,502	0,543	0,624
360	0,464	0,5	0,543	0,624
390	0,461	0,499	0,543	0,624
420	0,458	0,498	0,543	0,625
450	0,456	0,497	0,543	0,625
480	0,452	0,496	0,543	0,627
510	0,451	0,495	0,543	0,628
540	0,45	0,494	0,543	0,628
570	0,448	0,493	0,543	0,629
600	0,446	0,492	0,543	0,629
ERROR RELATIVO	0,205	0,18	0,1535	0,1175
Captación	0,4790	0,4225	0,3612	0,2720
% captacion	47,90	42,25	36,12	27,20
log c	2,40	2,10	1,40	0,40

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE DE <i>Conyza bonariensis</i> (AV)				
Tiempo (seg)	Abs. a 250ppm	Abs. a 125ppm	Abs. a 25ppm	Abs. a 2,5ppm
0	0,956	0,85	0,86	0,88
30	0,533	0,541	0,588	0,621
60	0,529	0,536	0,586	0,619
90	0,526	0,533	0,585	0,618
120	0,524	0,531	0,584	0,619
150	0,522	0,53	0,584	0,62
180	0,521	0,529	0,585	0,622
210	0,52	0,528	0,585	0,623
240	0,519	0,528	0,586	0,624
270	0,518	0,528	0,585	0,624
300	0,517	0,527	0,585	0,626
330	0,517	0,527	0,585	0,625
360	0,517	0,527	0,585	0,626
390	0,516	0,527	0,585	0,627
420	0,516	0,527	0,585	0,627
450	0,515	0,526	0,585	0,628
480	0,515	0,526	0,586	0,63
510	0,515	0,527	0,586	0,63
540	0,515	0,527	0,586	0,63
570	0,515	0,527	0,586	0,63
600	0,515	0,527	0,586	0,631
ERROR RELATIVO	0,2205	0,1615	0,137	0,1245
Captación	0,4613	0,3800	0,3186	0,2830
% captacion	46,13	38,00	31,86	28,30
log c	2,40	2,10	1,40	0,40

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE DE *Gnaphaliun pellitum* (HD)

Tiempo (seg)	Abs. a 250ppm	Abs. a 125ppm	Abs. a 25ppm	Abs. a 2,5ppm
0	0,956	0,82	0,824	0,83
30	0,486	0,49	0,549	0,592
60	0,489	0,486	0,553	0,591
90	0,488	0,485	0,553	0,591
120	0,489	0,482	0,553	0,59
150	0,488	0,481	0,553	0,59
180	0,488	0,48	0,553	0,59
210	0,489	0,479	0,552	0,59
240	0,489	0,477	0,552	0,591
270	0,489	0,477	0,552	0,591
300	0,489	0,476	0,552	0,591
330	0,489	0,475	0,552	0,591
360	0,49	0,475	0,552	0,592
390	0,49	0,475	0,552	0,592
420	0,49	0,474	0,553	0,592
450	0,491	0,474	0,553	0,592
480	0,493	0,473	0,554	0,592
510	0,493	0,473	0,554	0,592
540	0,494	0,473	0,554	0,592
570	0,495	0,472	0,554	0,592
600	0,495	0,472	0,554	0,592
ERROR RELATIVO	0,2305	0,174	0,135	0,119
Captación	0,4822	0,4244	0,3277	0,2867
% captación	48,22	42,44	32,77	28,67
log c	2.40	2,10	1,40	0,40

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE DE <i>Gnaphalium peltitum</i> (AV)				
Tiempo (seg)	Abs. a 250ppm	Abs. a 125ppm	Abs. a 25ppm	Abs. a 2,5ppm
0	0,772	0,808	0,796	0,758
30	0,54	0,562	0,58	0,585
60	0,528	0,56	0,58	0,58
90	0,523	0,56	0,58	0,58
120	0,525	0,56	0,58	0,58
150	0,522	0,56	0,58	0,58
180	0,52	0,56	0,58	0,581
210	0,518	0,561	0,58	0,582
240	0,516	0,561	0,581	0,583
270	0,514	0,561	0,581	0,584
300	0,513	0,561	0,58	0,584
330	0,511	0,561	0,58	0,584
360	0,51	0,561	0,58	0,584
390	0,509	0,56	0,58	0,584
420	0,508	0,56	0,58	0,583
450	0,508	0,56	0,58	0,584
480	0,507	0,56	0,579	0,584
510	0,506	0,559	0,579	0,584
540	0,504	0,558	0,578	0,585
570	0,504	0,556	0,577	0,586
600	0,503	0,555	0,577	0,585
ERROR RELATIVO	0,1345	0,1265	0,1095	0,0865
Captación	0,3484	0,3131	0,2751	0,2282
% captación	34,84	31,31	27,51	22,82
log c	2,40	2,10	1,40	0,40

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE DE <i>Achyrocline satureioides</i> (HD)				
Tiempo (seg)	Abs. a 250ppm	Abs. a 125ppm	Abs. a 25ppm	Abs. a 2,5ppm
0	0,982	0,874	0,814	0,818
30	0,57	0,576	0,57	0,617
60	0,569	0,575	0,568	0,613
90	0,569	0,575	0,568	0,612
120	0,569	0,575	0,569	0,612
150	0,569	0,575	0,569	0,612
180	0,569	0,576	0,569	0,612
210	0,569	0,576	0,57	0,612
240	0,57	0,576	0,57	0,612
270	0,57	0,576	0,572	0,614
300	0,571	0,577	0,572	0,614
330	0,571	0,577	0,573	0,615
360	0,572	0,578	0,574	0,615
390	0,573	0,578	0,575	0,616
420	0,573	0,579	0,576	0,617
450	0,574	0,579	0,576	0,618
480	0,575	0,58	0,577	0,619
510	0,576	0,581	0,579	0,619
540	0,576	0,581	0,579	0,621
570	0,577	0,582	0,58	0,622
600	0,578	0,583	0,581	0,622
ERROR RELATIVO	0,202	0,1465	0,117	0,098
Captación	0,4114	0,3330	0,2862	0,2396
% captación	41,14	33,30	28,62	23,96
log c	2,40	2,10	1,40	0,40

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE DE <i>Achyrocline satureioides</i> (AV)				
Tiempo (seg)	Abs. a 250ppm	Abs. a 125ppm	Abs. a 25ppm	Abs. a 2,5ppm
0	0,9	0,895	0,89	0,8
30	0,57	0,576	0,57	0,617
60	0,569	0,575	0,568	0,613
90	0,569	0,575	0,568	0,612
120	0,569	0,575	0,569	0,612
150	0,569	0,575	0,569	0,612
180	0,569	0,576	0,569	0,612
210	0,569	0,576	0,57	0,612
240	0,57	0,576	0,57	0,612
270	0,57	0,576	0,572	0,614
300	0,571	0,577	0,572	0,614
330	0,571	0,577	0,573	0,615
360	0,572	0,578	0,574	0,615
390	0,573	0,578	0,575	0,616
420	0,573	0,579	0,576	0,617
450	0,574	0,579	0,576	0,618
480	0,575	0,58	0,577	0,619
510	0,576	0,581	0,579	0,619
540	0,5	0,581	0,579	0,621
570	0,5	0,582	0,58	0,622
600	0,5	0,52	0,6	0,6
ERROR RELATIVO	0,2	0,1875	0,145	0,1
Captación	0,4444	0,4190	0,3258	0,2500
% captación	44,44	41,90	32,58	25,00
log c	2,40	2,10	1,40	0,40

ANEXO III Linealización de la capacidad antioxidante.

Ácido ascórbico			
IC 50		Log IC 50	
% Inhibición	ppm	% Inhibición	log ppm
23,85	0,03	23,85	(1,60)
30,44	0,25	30,44	(0,60)
46,68	2,50	46,68	0,40
92,31	25,00	92,31	1,40
92,53	125,00	92,53	2,10
92,62	250,00	92,62	2,40
pendiente	2,149	pendiente	0,0456
intercepto	-68,427	intercepto	-2,197
coef r2	0,488	coef r2	0,917
IC50 [ppm]	55,10	IC50 [ppm]	85,38

<i>Conyza bonariensis</i> (HD)			
IC 50		Log IC 50	
% Inhibición	ppm	% Inhibición	log ppm
27,20	2,50	27,20	0,40
36,12	25,00	36,12	1,40
42,25	125,00	42,25	2,10
47,90	250,00	47,90	2,40
pendiente	11,8121	pendiente	0,0993
intercepto	-352,571	intercepto	-2,238
coef r2	0,8597	coef r2	0,9829
IC50 [ppm]	34,08	IC50 [ppm]	39,64
aar	61,85	Log aar	46,43

<i>Conyza bonariensis (AV)</i>			
IC 50		Log IC50	
% Inhibición	ppm	% Inhibición	log ppm
28,30	2,50	28,30	0,40
31,86	25,00	31,86	1,40
38,00	125,00	38,00	2,10
46,13	250,00	46,13	2,40
pendiente	14,370	pendiente	0,105
intercepto	-417,718	intercepto	-2,206
coef r2	0,9883	coef r2	0,8493
IC50 [ppm]	32,55	IC50 [ppm]	37,28
aar	59,07	aar	43,66

<i>Gnaphalium pellitum (HD)</i>			
IC 50		Log IC50	
% Inhibición	ppm	% Inhibición	log ppm
28,67	2,50	28,67	0,40
32,77	25,00	32,77	1,40
42,44	125,00	42,44	2,10
48,22	250,00	48,22	2,40
pendiente	12,350	pendiente	0,0949
intercepto	-368,990	intercepto	-2,0355
coef r2	0,9510	coef r2	0,9074
IC50 [ppm]	33,93	IC50 [ppm]	39,36
aar	61,57	aar	46,10

<i>Gnaphalium pellitum (AV)</i>			
IC 50		Log IC 50	
% Inhibición	ppm	% Inhibición	log ppm
22,82	2,50	22,82	0,40
27,51	25,00	27,51	1,40
31,31	125,00	31,31	2,10
34,84	250,00	34,84	2,40
pendiente	20,6491	pendiente	0,1698
intercepto	-500,740	intercepto	-3,3724
coef r2	0,8895	coef r2	0,9723
IC50 [ppm]	26,67	IC50 [ppm]	29,87
aar	48,40	aar	34,98

<i>Achyrocline satureioides (AV)</i>			
IC 50		Log IC50	
% Inhibición	ppm	% Inhibición	log ppm
25,00	2,50	25,00	0,40
32,58	25,00	32,58	1,40
41,90	125,00	41,90	2,10
44,44	250,00	44,44	2,40
pendiente	11,4871	pendiente	0,09876
intercepto	-312,706	intercepto	-1,981
coef r2	0,8236	coef r2	0,9841
IC50 [ppm]	31,57	IC50 [ppm]	37,26
aar	57,30	aar	43,64

<i>Achyrocline satureioides (HD)</i>			
IC 50		Log IC50	
% Inhibición	ppm	% Inhibición	log ppm
23,96	2,50	23,96	0,40
28,62	25,00	28,62	1,40
33,30	125,00	33,30	2,10
41,14	250,00	41,14	2,40
pendiente	15,1609	pendiente	0,1134
intercepto	-380,813	intercepto	-2,0278
coef r2	0,9674	coef r2	0,8747
IC50 [ppm]	28,42	IC50 [ppm]	32,87
aar	51,57	aar	38,50

ANEXO IV CERTIFICADO IDENTIFICACIÓN PLANTAS



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE CIENCIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES
HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)

COL - 117

Bogotá D.C., 25 de marzo de 2015

Señores

Prof. William Alejandro Andrade Barreiro
Ciudad

Asunto: **Identificación Taxonómica**
muestras Cordial Saludo,

Me permito dar respuesta a su solicitud referente a la identificación taxonómica de la(s) muestra(s) botánica(s):

Nombre	FAMILIA	No. COL	Colector	No de Colecta	Determinó
<i>Achyrocline satureioides. (L.)</i>	ASTERACEAE	582522	William A. Andrade B.	3	C. Parra-0./2015
<i>Gnaphalium aff. pellitum</i>	ASTERACEAE	582791	William A. Andrade B.	4	C. Parra-0./2015
<i>Conyza bonariensis (L.)</i>	ASTERACEAE	582520	William A. Andrade B.	2	C. Parra-0./2015

Esta certificación no es válida para trámites ante el INVIMA o el ICA. El (Los) pliego(s) testigo(s) quedará(n) como muestra permanente en nuestro herbario.

Cordialmente,

Prof. CARLOS ALBERTO PARRA
Administrador General