

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO

**Composición química, actividad antioxidante y anti-
Candida albicans del aceite esencial de *Clinopodium
pulchellum (Kunth) Govaerts “panizara”***

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Farmacia y
Bioquímica

AUTOR

Edgar Robert TAPIA MANRIQUE

ASESOR

Américo Jorge CASTRO LUNA

Lima – Perú

2018

AGRADECIMIENTO

- A Dios porque nada de esto hubiera sido posible sin Él.
- A mi Alma Mater, la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Al Dr. Américo Castro Luna, asesor de la presente tesis, Maestro que con sus enseñanzas y sugerencias se concretó el estudio.
- A los miembros del jurado por sus correcciones y sugerencias.
- A los Doctores por su amistad y orientación: Gerardo Gamarra Ballena, María Elena Salazar Salvatierra, Gladys Arias Arroyo, María Elizabeth Gonzáles Loayza, Delia Whu Whu, Eddy Carbajal Silva.
- Laboratorio LABICER de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería.
- Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

DEDICATORIA

- A mis adoradas hijas, Grace y Andrea, que representan lo más maravilloso de mi existencia y me motivan a seguir superándome.
- A mi esposa y compañera de toda mi vida Katherina, por su apoyo y comprensión.
- A mis queridos padres, Alonso y René, por su apoyo incondicional en toda mi formación profesional y que son ejemplos de superación y admiración.
- A mis queridos hermanos Hugo, Freddy y Janet.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	X
SUMMARY	XI
RESUMO	XII
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Situación problemática	1
1.2. Formulación del problema	3
1.3. Justificación teórica	4
1.4. Justificación práctica	4
1.5. Objetivos	5
1.5.1. Objetivo general	5
1.5.2. Objetivos específicos	5
1.6. Hipótesis	5
1.6.1. Hipótesis general	5
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO	6
2.1. Marco filosófico o Epistemológico de la investigación	6
2.2. Antecedentes de la investigación	7
2.3. Bases teóricas	9
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA	25
3.1 Materiales, reactivos y equipos	25
3.2 Institución donde se ejecutó la investigación	26
3.3 Tipo y diseño de la investigación	27
3.4 Diseño del trabajo experimental	28
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38

4.1. Resultados	39
4.2. Discusión	72
CONCLUSIONES	80
RECOMENDACIONES	81
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXOS	93

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Preparación de los tubos para el ensayo del DPPH

Tabla 2. Análisis preliminar y constantes físicas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”

Tabla 3. Primera parte de la composición química del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” determinado por Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM)

Tabla 4. Segunda parte de la composición química del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” determinado por Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM)

Tabla 5. Resultados de la actividad antioxidante por el método del DPPH del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”

Tabla 6. Resultados de la actividad antioxidante por el método del ABTS del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”

Tabla 7. Resultados de la actividad antifúngica del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” frente a *Candida albicans* empleando el método de difusión en agar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”

Figura 2. Ejemplos de monoterpenos

Figura 3. Ejemplos de sesquiterpenos

Figura 4. Ejemplos de fenilpropanos

Figura 5. *Candida albicans* levaduriforme

Figura 6. *Candida albicans* filamentosa

Figura 7. Flujograma del trabajo experimental

Figura 8. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante

Figura 9. Estructura del ABTS^{•+} antes y después de la reacción con el antioxidante

Figura 10. Primera parte del Cromatograma de Gas del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” de 3 a 20 minutos

Figura 11. Segunda parte del Cromatograma de Gas del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” de 20 a 40 minutos

Figura 12. Tercera parte del Cromatograma de Gas del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” de 40 a 60 minutos

Figura 13. Espectro de la estructura del 2-etil furano

Figura 14. Espectro de la estructura del 2,5-norbornadieno

Figura 15. Espectro de la estructura del 2-metil butanoato de metilo

Figura 16. Espectro de la estructura del 2,4-dimetil hexano

Figura 17. Espectro de la estructura del 2-metil butanoato de etilo

Figura 18. Espectro de la estructura del 3-metil butanoato de etilo

Figura 19. Espectro de la estructura del acetato de (2-metil) butilo

Figura 20. Espectro de la estructura del 1,7,7-trimetil triciclo [2.2.1.0(2,6)] heptano

Figura 21. Espectro de la estructura del 2-metil-5-(1-metiletil) biciclo [3.1.0] 2-hexeno

Figura 22. Espectro de la estructura del alfa-pineno

Figura 23. Espectro de la estructura del canfeno

Figura 24. Espectro de la estructura del beta-felandreno

Figura 25. Espectro de la estructura del beta-pineno

Figura 26. Espectro de la estructura del beta-mirceno

Figura 27. Espectro de la estructura del 1-metil-4-(1-metiletilideno) ciclohexeno (terpinoleno)

Figura 28. Espectro de la estructura del O-cimeno

Figura 29. Espectro de la estructura del D-Limoneno

Figura 30. Espectro de la estructura del eucaliptol

Figura 31. Espectro de la estructura del trans-beta-ocimeno

Figura 32. Espectro de la estructura del 3,7-dimetil- 1,3,6-octatrieno (Z-ocimeno)

Figura 33. Espectro de la estructura del gamma-terpineno

Figura 34. Espectro de la estructura del 2-metil-5-(1-metiletil)-, (1. alfa.,2. alfa.,5. alfa) biciclo [3.1.0] 2-hexanol

Figura 35. Espectro de la estructura del 2-careno

Figura 36. Espectro de la estructura del 2-metil-5-(1-metiletil)-, (1. alfa.,2. beta.,5. alfa) biciclo [3.1.0] 2-hexanol

Figura 37. Espectro de la estructura del 1,3,3-trimetil-2-etenil ciclohexeno

Figura 38. Espectro de la estructura del linalool

Figura 39. Espectro de la estructura del 2-metil butanoato de (2-metil) butilo

Figura 40. Espectro de la estructura del 3-metil butanoato de (2-metil) butilo

Figura 41. Espectro de la estructura del acetato de 3-octilo

Figura 42. Espectro de la estructura del 6,6-dimetil- 2-metileno-[1S-(1. alfa.,3. alfa.,5. alfa)] biciclo [3.1.1] 3-heptanol

Figura 43. Espectro de la estructura del citronelal

Figura 44. Espectro de la estructura del endo-borneol

Figura 45. Espectro de la estructura del terpinen-4-ol

Figura 46. Espectro de la estructura del 4-metil-1-(1-metiletil) ciclohexeno (p-menteno)

Figura 47. Espectro de la estructura del alfa-terpineol

Figura 48. Espectro de la estructura del 6,6-dimetil biciclo [3.1.1] 2-hepten-2-carboxaldehído

Figura 49. Espectro de la estructura del 6,6-dimetil biciclo [3.1.1]2-hepten-2-ol

Figura 50. Espectro de la estructura del 4-(1-metiletil) benzaldehído (cuminaldehído)

Figura 51. Espectro de la estructura del acetato de linalilo

Figura 52. Espectro de la estructura del 3,7-dimetil-6-en- octato de metilo

Figura 53. Espectro de la estructura del acetato de bornilo

Figura 54. Espectro de la estructura del 3,7-dimetil-2,6-dien- octato de metilo (geranato de metilo)

Figura 55. Espectro de la estructura del cariofileno

Figura 56. Espectro de la estructura del germacreno D

Figura 57. Gráfica de dispersión entre el porcentaje de actividad antioxidante del radical DPPH versus concentraciones del aceite esencial de panizara

Figura 58. Gráfica de dispersión entre el porcentaje de actividad antioxidante del radical DPPH versus las concentraciones del trolox

Figura 59. Gráfica de dispersión entre el porcentaje de actividad antioxidante del radical ABTS^{•+} versus concentraciones del aceite esencial de panizara

Figura 60. Gráfica de dispersión entre el porcentaje de actividad antioxidante del radical ABTS^{•+} versus las concentraciones del trolox

ABREVIATURAS

ERO: especies reactivas del oxígeno

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

ABTS^{•+}: Acido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico

Trolox: Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico

CG/EM: Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas

RL: radicales libres

BHT: Butil hidroxitolueno

BHA: Butil hidroxianisol

TBHQ: Terbutil hidroquinona

PG: Galato de propilo

SOD: Superóxido dismutasa

DMSO: Dimetilsulfóxido

CAT: catalasa

RUV: radiación ultravioleta

IC₅₀ : concentración inhibitoria al 50%

O₂⁻ : anión superóxido

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

OH[•]: radical hidroxilo

CMI: concentración mínima inhibitoria

RESUMEN

Se evaluó la composición química del aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”, actividad antioxidante *in vitro* y la actividad antifúngica *in vitro*, frente a *Candida albicans*. El aceite esencial se obtuvo tratando 5 Kg de hojas en un sistema de hidrodestilación con arrastre de vapor de agua a temperatura y presión controlada, reportándose un rendimiento de 0,58 %v/p; se realizó el análisis preliminar y las propiedades fisicoquímicas del aceite esencial encontrándose los siguientes resultados: líquido oleoso y aromático, ligeramente amarillo, insoluble en agua, ligeramente soluble en metanol, soluble en etanol, n-hexano y éter etílico, densidad (0,978 g/mL), pH (5,60) e índice de refracción (1,475). En el análisis cualitativo-cuantitativo de la composición química del aceite esencial realizado por Cromatografía de Gases y Espectrofotometría de Masas (CG/EM), se identificaron 44 compuestos químicos, conformados por 15 hidrocarburos monoterpénicos, 15 monoterpenos oxigenados, 2 hidrocarburos sesquiterpénicos, 6 ésteres, 2 alcoholes cíclicos, 2 hidrocarburos cíclicos, 1 alcano y 1 compuesto heterocíclico aromático. La evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial se determinó utilizando los siguientes métodos: método de captación del radical DPPH y el método de captación del radical ABTS^{•+}, los resultados indican que el aceite esencial presenta actividad antioxidante variable; por el método del DPPH resultó tener una actividad antioxidante no significativa frente al patrón estándar Trolox. Asimismo, por el método del radical ABTS^{•+}, se obtuvo una actividad antioxidante significativa frente al estándar. La determinación de la actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial, se realizó empleando el método de difusión en agar mostrando actividad significativa frente a *Candida albicans* en concentraciones de 100, 75 y 50 por ciento, utilizando la nistatina como control positivo.

Palabras clave: aceite esencial, *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts, actividad antioxidante, actividad antifúngica, *Candida albicans*.

SUMMARY

The chemical composition of the essential oil of the *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts "panizara" leaves was evaluated, antioxidant activity in vitro and the antifungal activity in vitro, against *Candida albicans*. The essential oil is obtained 5 kg of leaves in a hydro distillation system with water vapor drag at temperature and controlled pressure, reporting a yield of 0.58% v / p was reported; The preliminary analysis and the physicochemical properties of the essential oil were also carried out, with the following results: oily and aromatic liquid, slightly yellow, insoluble in water, slightly soluble in methanol, soluble in ethanol, n-hexane and ethyl ether, density (0.978 g) / mL), pH (5.60) and refractive index (1.475). In the qualitative-quantitative analysis of the chemical injection of the essential oil made by Gas Chromatography and Mass Spectrometry (GC / MS), 44 chemical compounds were identified, consisting of 15 monoterpene hydrocarbons, 15 oxygenated monoterpene, 2 sesquiterpene hydrocarbons, 6 esters, 2 cyclic alcohols, 2 cyclic hydrocarbons, 1 alkane and 1 aromatic heterocyclic compound. The evaluation of the in vitro antioxidant activity of the essential oil was determined using the following methods: DPPH radical uptake method and the ABTS^{•+} radical uptake method, the results indicate that essential oil shows variable antioxidant activity; thus we have when evaluating by the DPPH method it turns out to have a non-significant antioxidant activity against the standard Trolox standard. Also, by the ABTS^{•+} method, significant antioxidant activity was obtained compared to the standard Trolox standard. The determination of the antifungal activity in vitro of the essential oil was carried out using the agar diffusion method showing significant activity against *Candida albicans* at levels of 100, 75 and 50 percent, using nystatin as a positive control

Key words: essential oil, *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts, antioxidant activity, antifungal activity, *Candida albicans*.

RESUMO

A composição química do óleo essencial das folhas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts "panizara", atividade antioxidante in vitro e atividade antifúngica in vitro, contra *Candida albicans*. O óleo essencial foi obtido tratando aproximadamente 5 kg de folhas em um sistema de destilação hidrelétrica com vapor de vapor a temperatura e pressão controladas, foi relatado um rendimento de 0,58% v / p; A análise preliminar e as propriedades físico-químicas do óleo essencial também foram realizadas, com os seguintes resultados: Líquido oleoso e aromático, ligeiramente amarelo, insolúvel em água, ligeiramente solúvel em metanol, solúvel em etanol, n-hexano e éter etílico, densidade (0,978 g / mL), pH (5,60) e índice de refração (1,475). No análise qualitativa-quantitativa da composição química do óleo essencial produzido por Cromatografia de Gás e Espectrometria de Massa (GC / MS), foram identificados 44 compostos químicos, constituídos por 15 hidrocarbonetos monoterpênicos, 15 monoterpênicos oxigenados, 2 hidrocarbonetos sesquiterpênicos, 6 ésteres , 2 álcoois cíclicos, 2 hidrocarbonetos cíclicos, 1 alceno e 1 composto heterocíclico aromático. A avaliação da atividade antioxidante in vitro do óleo essencial foi determinada utilizando os seguintes métodos: o método de captação radical de DPPH e o método de captação de radical ABTS^{•+}, os resultados indicam que o óleo essencial de panizara mostra atividade antioxidante variável; também, quando avaliamos pelo método DPPH, resulta uma atividade antioxidante não significativa contra o padrão padrão de trolox. Também, pelo método ABTS^{•+}, uma atividade antioxidante significativa foi obtida em comparação com o padrão padrão de trolox. A determinação da atividade antifúngica in vitro do óleo essencial foi realizada usando o método de difusão em ágar mostrando atividade significativa contra *Candida albicans* em concentrações de 100, 75 e 50 por cento, usando nistatina como controle positivo.

Palavras-chave: óleo essencial, *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts, atividade antioxidante, atividade antifúngica, *Candida albicans*.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Situación Problemática

El hombre a través de la historia, ha empleado y sigue utilizando una serie de recursos vegetales que presentan diferentes propiedades medicinales y que son de gran utilidad para mitigar o tratar una serie de dolencias.

En las últimas décadas se vienen estudiando las propiedades de diversas especies vegetales, dentro de estas la actividad antioxidante de diversos productos que en los procesos biológicos implican reacciones redox, especialmente en los organismos aerobios; procesos fisiológicos como el envejecimiento, fisiopatológicos, respuesta inflamatoria y patológicos como la diabetes o enfermedades cardiovasculares en los que la generación de radicales libres y la defensa antioxidante son claves para conservar la homeostasis de los sistemas biológicos y el balance redox (Ceci, 2014; Birben, 2012).

En los sistemas biológicos, se generan radicales libres que son moléculas con elevada reactividad desde el momento de la concepción hasta la muerte. Todos ellos constituyen las denominadas especies reactivas del oxígeno (ERO). Estas ERO son necesarias para mantener las funciones fisiológicas en todo organismo aerobio, sin embargo pueden producirse ocasionalmente en cantidades suficientemente elevadas que conducen a estados fisiopatológicos y patológicos (Suarez, 2014).

En las mismas condiciones en las que se producen las ERO, los organismos producen una serie de biomoléculas de pequeño y elevado peso molecular que actúan como parte de un complejo sistema antioxidante enzimático y no enzimático, que permite mantener la homeostasis del estado redox del organismo. Sin embargo, en situaciones en las que se establece un

desbalance entre estos dos mecanismos se produce un estado de estrés oxidativo (Birben, 2012).

El ser humano además de sintetizar una serie de biomoléculas antioxidantes también utiliza fuentes antioxidantes exógenas, principalmente de fuente vegetal, convirtiendo a las EROs en moléculas con menor potencial injuriante.

Por otro lado, se sabe que durante los últimos años se ha incrementado la incidencia de enfermedades fúngicas (Navarro, 2003), el aumento considerable de pacientes inmunocomprometidos, quimioterapia, nutrición parenteral, cirugía de transplante y el uso de agentes antimicrobianos de amplio espectro, agregados a la presencia de SIDA, dan verdaderas “placas petri vivientes” individuales, quienes son altamente susceptibles a las infecciones oportunistas. Las infecciones fúngicas sistémicas y dérmicas son la causa de gran morbi-mortalidad en este tipo de pacientes, siendo la dermatomicosis un problema serio para niños de países en desarrollo como una consecuencia de un cuidado sanitario deficiente (Lopez, 2001).

Las micosis causadas por especies del género *Candida* y especialmente por *Candida albicans*, ha aumentado en las últimas tres décadas. La zona más frecuentemente afectada son los pliegues cutáneos donde la humedad crea un hábitat adecuado para su supervivencia. Se puede manifestar como: intertrigo de grandes pliegues, erosión interdigital, candidiasis del pañal, foliculitis, onicomycosis candidiástica con parinoquia y perionixis (Kim, 2011).

Nuestro país reconocido como territorio megadiverso tiene una variada riqueza de suelos debido a las diversas zonas geográficas, factores edáficos y otros factores ambientales, que favorecen el desarrollo de un gran número de recursos vegetales con diversas propiedades terapéuticas, como la antioxidante y antifúngica.

Las plantas aromáticas de la familia Lamiaceae son usadas como infusiones y han sido ampliamente estudiadas por la presencia de antioxidantes y por

sus propiedades antimicrobianas. Dentro de esta familia se encuentra el género *Clinopodium*, el cual ha sido objeto de diversas investigaciones acerca de la actividad antioxidante y antimicrobiana en aceites esenciales y en diversos extractos, sin embargo, no hay investigaciones reportados de la especie vegetal *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” con respecto al estudio de la composición química del aceite esencial de las hojas y de las actividades antioxidante y antifúngica frente a *Candida albicans*.

La problemática descrita, exige la necesidad de realizar la presente investigación, a fin de buscar alternativas de fuentes naturales con propiedades antioxidantes y antifúngicas frente a *Candida albicans*.

1.2. Formulación del Problema

¿El aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”, tendrá actividad antioxidante y antifúngica frente a *Candida albicans*, por la naturaleza química de sus componentes químicos?

1.3. Justificación teórica

- Búsqueda de aceites esenciales con actividad antioxidante para tenerlos como alternativos frente a los antioxidantes sintéticos.
- Búsqueda de aceites esenciales con actividad antifúngica frente a *Candida albicans*.

1.4. Justificación práctica

- Contribuir al conocimiento de los componentes químicos del aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”.
- Contribuir al conocimiento de la propiedad antioxidante y antifúngica del aceite esencial frente a *Candida albicans*.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

- Elucidar la estructura de los componentes químicos y evaluación de la actividad antioxidante y antifúngica frente a *Candida albicans* del aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”.

1.5.2. Objetivos específicos

- Extraer el aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”, por el método de arrastre por vapor de agua.
- Caracterizar los componentes químicos del aceite esencial, por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/EM).
- Evaluar la actividad antioxidante *in vitro*, utilizando el método de capacidad captadora del radical DPPH y el método de capacidad captadora del radical ABTS^{•+}.
- Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de *Candida albicans*, utilizando el método de Difusión en Agar.

1.6. Hipótesis

1.6.1. Hipótesis general

- El aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”, presenta actividad antioxidante y anti-*Candida albicans*, por la naturaleza de sus componentes químicos.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación

La investigación es un proceso que se caracteriza por ser reflexiva, sistemática y metódica que nos permite estudiar un fenómeno o problemas científicos. Por lo tanto, esa capacidad de investigar nos facilita obtener conocimientos científicos, es decir conocimientos que se procura sean objetivos, sistemáticos, claros y verificables. Todo este proceso permite crear y facilitar el bienestar integral del ser humano.

Dos mitos se han construido alrededor de la investigación científica: una que considera que la investigación es complicada y difícil, y otra que no está vinculada al mundo cotidiano y a la realidad (Sampieri, 2014). Sin embargo, a través de la investigación se ha perfeccionado procesos metodológicos, creando nuevas soluciones que han servido al desarrollo desde las primeras civilizaciones hasta la actualidad.

Los diferentes tipos de interrogantes e hipótesis demandan diferentes tipos de diseños metodológicos y en una investigación, estos realmente se clasifican en cuantitativos y cualitativos (Sousa, 2007). El diseño de la investigación cuantitativa representa una guía correctamente estructurada y exacta de cómo se va a realizar la investigación; los planteamientos que se van investigar son específicos y delimitados desde el inicio del estudio; por consiguiente, debe ser objetiva y seguir un patrón predecible y estructurado, teniendo como meta principal formular y demostrar las teorías.

La presente investigación se sustenta en las bases epistemológicas con enfoque hipotético deductivo en la línea de investigación que busca nuevas sustancias naturales con actividad antioxidante y antifúngica frente a *Candida albicans*.

2.2. Antecedentes de la investigación

En relación a la problemática del presente estudio, existen diversas investigaciones, realizadas en otras especies vegetales; las cuales se precisan a continuación:

El autor Alonso, NC., (2009), desarrolló el trabajo de investigación titulada “Actividad antioxidante de *Satureja macrostema*”. El objetivo fue evaluar la actividad antioxidante del extracto de las hojas de *Satureja macrostema*, por el método de DPPH. El autor concluyó que el extracto de las hojas de *Satureja macrostema*, presenta componentes químicos como fuente de antioxidantes.

Los autores Castañeda et al. (2008), realizaron la evaluación de la capacidad antioxidante de extractos de las siguientes plantas medicinales: *Cinnamomum zeylanicum* “canela”, *Calophyllum brasiliense* “lagarto caspi”, *Myrciaria dubia* “camu camu”, *Minthostachys mollis* “muña”, *Alchomea castaneifolia* “hiporuro”, *Smilax sonchifolius* “yacón”, *Lepidium peruvianum* y *Lepidium meyenii* “maca”, por el método del DPPH. La capacidad antioxidante obtenida a las concentraciones de 1 ug/mL, 50 ug/mL, 100 ug/mL y 200 ug/mL, fueron: canela 97,59 % a una concentración de 1 ug/mL, lagarto caspi 99,76% a 50 ug/mL, camu camu 98,09 % a 50 ug/mL, muña 92,41 % a 50 ug/mL, hiporuro 75,96 % a 50 ug/mL, lagarto 110,56 % a 100 ug/mL, maca 95,56 % a 200 ug/mL, comparando frente al ácido ascórbico (vitamina C), la cual presentó una actividad antioxidante de 92,82 %.

Carhuapoma, M., (2007), al estudiar los componentes químicos del aceite esencial de la *Satureja brevicalyx*, determinar su actividad anti- *Helicobacter pylori* y antioxidante, concluyó que el aceite esencial posee efecto anti- *Helicobacter pylori* y muestra un significativo efecto antioxidante, comparado con el rolox.

Castro, A., (2008), al estudiar la “Composición química del aceite esencial de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) coca, actividad

antioxidante y antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*”, empleándolos métodos de captación del radical 2,2- difenilpicrilhidrazil, captación del radical superóxido y la captación del radical hidroxilo. Y la actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Streptococcus mutans*, concluyó que el aceite esencial, presenta actividad antioxidante y actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*.

Rodríguez, J., (2014), en su estudio sobre la “Estructura química y actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial de *Eryngium foetidum* L. (siuca culantro)”. Llegó a la conclusión que el aceite esencial aplicando el método del DPPH tiene actividad antioxidante.

Tchakam PD. et al.,(2012), reportaron que el extracto metanólico de las hojas de *Hypericum lanceolatum* tiene una CMI de 512 µg/mL contra *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* y de 64 µg/mL contra *Trichophyton rubrum*, determinados por el método de microdilución en caldo.

2.3. Bases teóricas

2.3.1. Aspectos botánicos

2.3.1.1. Clasificación sistemática

Según el sistema de clasificación de Cronquist (1988), la especie vegetal *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts; presenta la siguiente categoría taxonómica:

DIVISIÓN : Magnoliophyta

CLASE : Magnoliopsida

SUBCLASE : Asteridae

ORDEN : Lamiales

FAMILIA : Lamiaceae

GÉNERO : *Clinopodium*

ESPECIE : ***Clinopodium pulchellum*** (Kunth) Govaerts

Nombre común: panizara, limoncillo. (Anexo 1)

2.3.1.2. Características de la familia Lamiaceae

La familia Lamiaceae comprende alrededor de 220 géneros y unas 4000 especies, casi cosmopolitas. Aun cuando esta familia tiene su centro de diversidad en Europa, principalmente en el área del mediterráneo, su presencia en América es importante, ya que muchas especies introducidas se han naturalizados (Velazquez, 1997).

La familia Lamiacea es reconocida en el Perú por presentar alrededor de 21 géneros, mayormente hierbas y arbustos (Rodríguez, 2006).

La mayoría de las especies presentes en el Perú se encuentran registradas en el norte, especialmente los Andes constituyen un importante hábitat, entre los 1500-4250 m de altitud (Sagástegui, 2012).

2.3.1.3. Género *Clinopodium*

El género *Clinopodium* cuenta con unas 200 especies en el mundo, todas estas especies son de regiones templadas y tropicales de ambos hemisferios de la Tierra. En el Perú se han identificado unas 26 especies, de las cuales 20 son endémicas. El ***Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts** es una especie endémica de la región norte del país (Rodríguez, 2006).

2.3.1.4. Descripción botánica de la *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”

Es una planta herbácea, aromática y tiene un tallo delgado que se desarrolla en forma de mata y muy ramificado. Sus hojas son pequeñas, con base acorazonada y ápice agudo, dentadas, verde en la cara superior y blanca en la inferior debido a que es pubescente. Sus flores son pequeñas y labiadas, pentámeras; con cinco sépalos y cinco pétalos unidos (Instituto Cuencas, 2012).

2.3.1.5.- Distribución geográfica

Especie ampliamente distribuida en el norte de país, se le encuentra en laderas abiertas y rocosas, también a orillas y acequias, quebradas arcillosas-rocosas, bordes de carreteras. Terrenos boscosos y arcilloso-pedregosos ubicados entre los 2800- 3500 msnm, en los departamentos de Cajamarca, Ancash y La Libertad (Rodríguez, 2006).

2.3.1.6.- Esencia

La esencia se encuentra principalmente en las hojas, el aroma es muy intenso y perdurable, es excelente para fragancias y fitocosméticos. Nuestras investigaciones van a permitir caracterizar las constantes físicoquímicas del aceite esencial como son: densidad, pH, índice de refracción y pruebas organolépticas como el color, olor y sabor.

2.3.1.7.- Usos en la medicina tradicional

El *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” (ver figura 1) es efectiva para combatir los trastornos del sistema digestivo y controla las flatulencias o gases estomacales. Se emplea para prevenir la indigestión y puede ser usada como un efectivo relajante (Instituto Cuencas, 2012).



Figura 1. *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”

2.3.2. Aceites esenciales

Pérez (2012), define a los aceites esenciales como fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéuticas.

Simon (2001), señala en general que los aceites esenciales constituyen el 0.1 al 1% del peso de la planta seca. A temperatura ambiente son incoloros o amarillentos, casi siempre menos denso que el agua, con alto índice de refracción, insolubles en agua, soluble en alcohol, lípidos y solventes orgánicos.

Martinez (2003), refiere desde el punto de vista químico y a pesar de su composición compleja con diferentes tipos de sustancias, los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de sustancias que son los componentes mayoritarios. Según esto los aceites esenciales ricos en monoterpenos (ver figura 2) se denominan aceites esenciales monoterpenoides (hierbabuena, albahaca, salvia, etc.). Los ricos en sesquiterpenos (ver figura 3) son los aceites esenciales sesquiterpenoides (copaiba, pino, junípero, etc). Los ricos en fenilpropanos (ver figura 4) son los aceites esenciales fenilpropanoides (clavo, canela, anís, etc.).

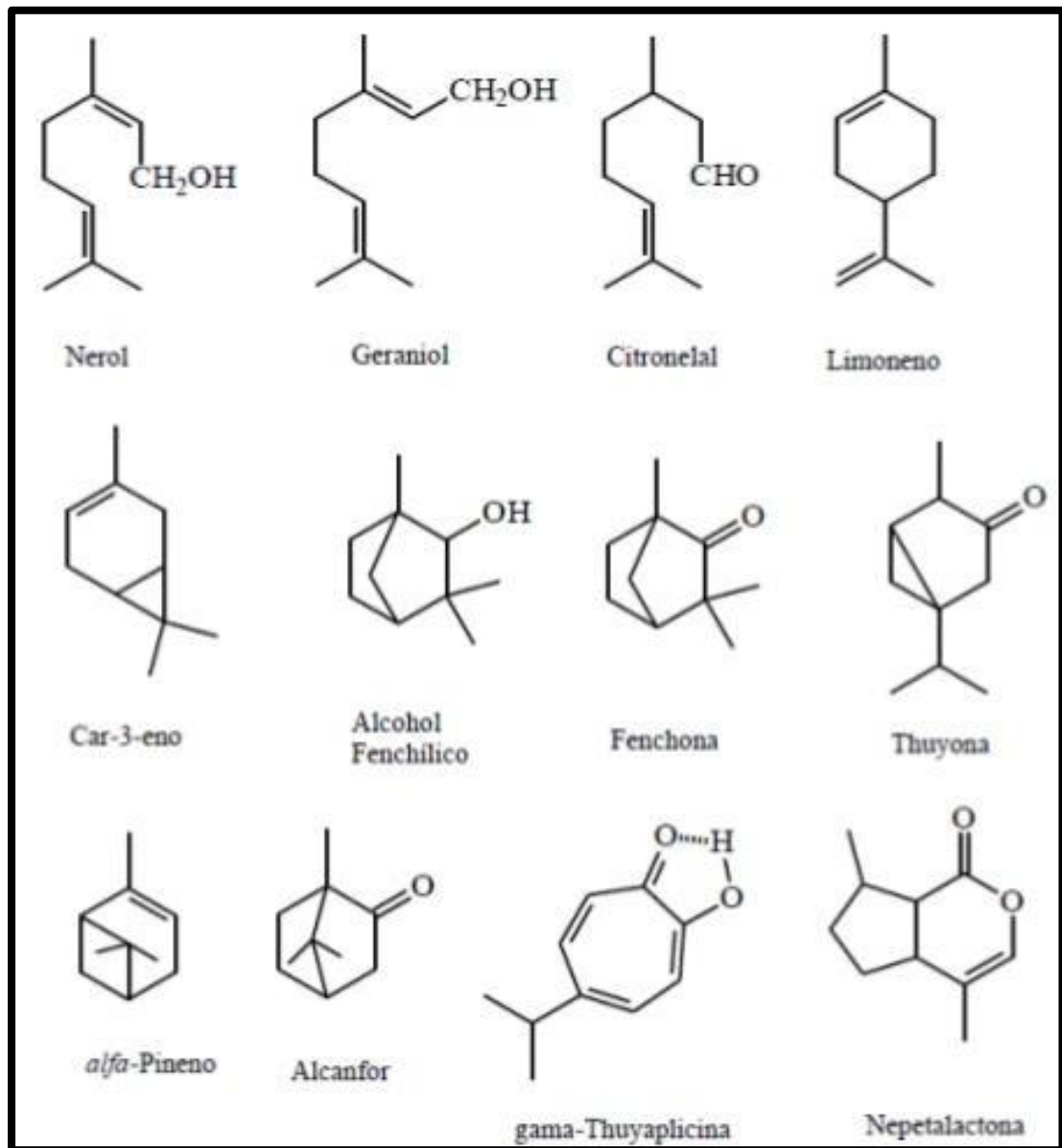


Figura 2. Ejemplos de monoterpenos

Fuente. Datos tomados de Rubiano (2000)

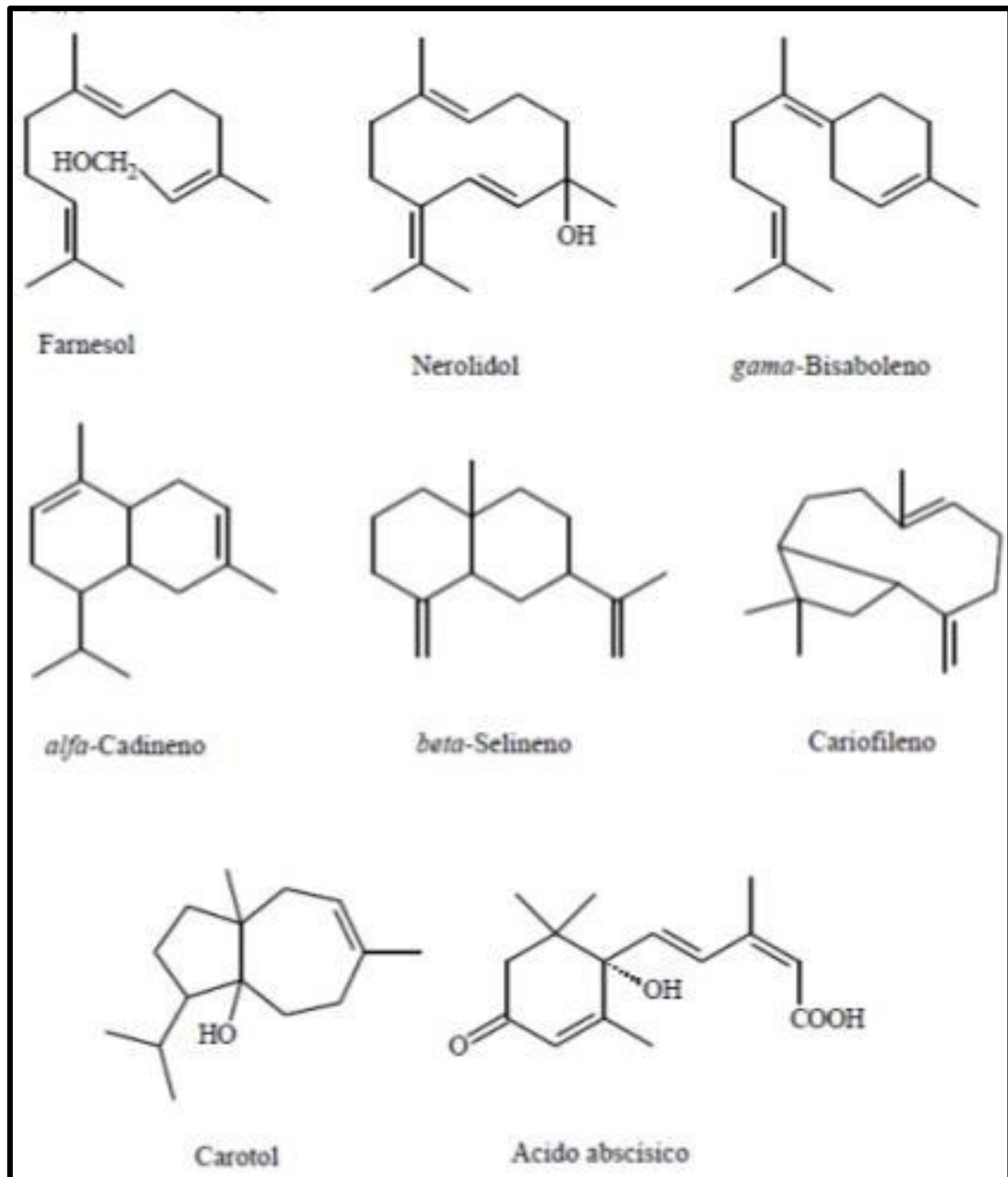


Figura 3. Ejemplos de sesquiterpenos

Fuente. Datos tomados de Ramirez (2000)

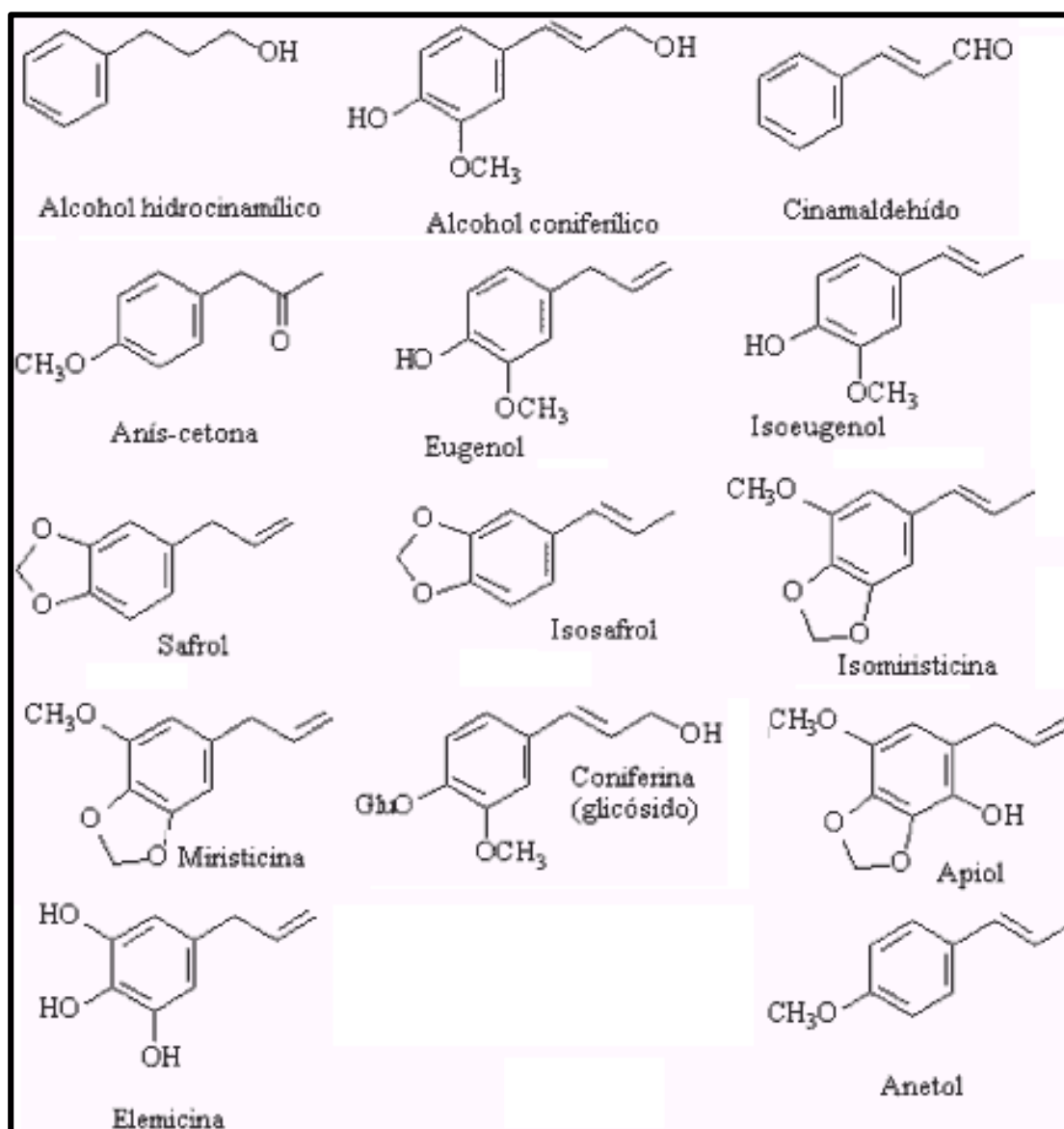


Figura 4. Ejemplos de fenilpropanos

Fuente: Datos tomados de Salamanca Grosso (2000)

2.3.2.1. Métodos de extracción de aceites esenciales

De acuerdo con Martínez (2003), los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son: destilación por arrastre con vapor de agua, expresión, extracción con solventes volátiles, enfleurage y con fluidos supercríticos.

En la **destilación por arrastre con vapor de agua**, la muestra vegetal generalmente seca y cortada en trozos pequeños, es encerrada en una cámara inerte y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias fluidas, especialmente las utilizadas para perfumería. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada (Martínez, 2003).

En la **expresión**, el material vegetal es exprimido para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para el caso de las esencias de cítricos (Martínez, 2003).

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

En el método de **enflorado o enfleurage**, el material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con un aceite vegetal. La esencia es solubilizada en el aceite vegetal que actúa como vehículo

extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla de aceite esencial y aceite vegetal la cual es separada posteriormente por otros medios fisicoquímicos. Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa (Martínez, 2003).

El método de **extracción con fluidos supercríticos**, es de desarrollo más reciente. El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un líquido supercrítico (por ejemplo dióxido de carbono líquido), las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor y se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, y finalmente se obtiene una esencia pura. Aunque, presenta varias ventajas como rendimiento alto, es ecológicamente compatible, el solvente se elimina fácilmente e inclusive se puede reciclar, y las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no cambian químicamente los componentes de la esencia, sin embargo el equipo requerido es relativamente costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones (Martínez, 2003).

2.3.2.2. Localización de los aceites esenciales en las plantas

Según Miller (1967), hace referencia que existen aproximadamente 2000 especies de plantas producen aceites esenciales. Las especies que proporcionan mayor cantidad de aceites esenciales pertenecen a las Familias Labiadas, Umbelíferas, Compuestas, Mirtáceas, Laureáceas, Rutáceas y Pináceas. Los aceites esenciales se hallan en regiones circunscritas de la planta como son: raíz, tallos, hojas; son segregados por estructuras especializadas como los pelos glandulares, cavidades esquizógenas.

2.3.3. Radicales libres

Los radicales libres (RL) son especies químicas con electrones desapareados en su capa de valencia, esta característica les permite participar en reacciones de cadena que comprende inicio, propagación y terminación. Generalmente son inestables, altamente reactivos y de tiempo de vida muy cortos; depende de su estructura química y del medio donde se producen (Suárez, 2014).

Los radicales libres son átomos, por lo general de oxígeno, altamente reactivos e inestable: que se liberan cuando el alimento es metabolizado en nuestra célula para producir energía y son inactivos por mecanismo enzimático y otros de atrapamiento (Depeng, 2003).

En el ser humano se generan radicales libres en la cadena respiratoria mitocondrial, cuando reacciona el peróxido de hidrógeno con el ion ferroso, por acción catalítica de la ciclooxigenasa, la reacción de la vitamina C con el ion ferroso, por acción de la NADPH reductasa, etc (Guija et al., 2015).

Sin embargo, la formación de los radicales libres en los sistemas biológicos está también estrechamente relacionada con alteraciones funcionales que conducen a diversas patologías como la aterosclerosis, diabetes y cáncer por citar algunos. En estos casos se trata de alteración de las concentraciones fisiológicas de la EROS, que en algunas situaciones pueden formar parte del origen de una enfermedad y en otras puede ser la consecuencia de ella. Hasta el momento no es fácil determinar el rol exacto (Suárez, 2014).

2.3.4. Antioxidantes

Son sustancias capaces de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, sin perder su estabilidad electroquímica. Actúan donando electrones y evitando que los radicales libres los capten de las células. Los antioxidantes utilizados en alimentos, previenen o inhiben el desarrollo de la rancidez o la aparición de otros compuestos de deterioro debido a la oxidación (Huang 2005; Pokony et al., 2001; Shahidi et al., 1992).

En los seres vivientes existen sistemas de defensa antioxidante que tiene la propiedad de impedir la acción nociva de los radicales libres, habiéndose identificado compuestos con propiedades antioxidantes de naturaleza enzimática como la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, etc., como sustancias no enzimáticas: ácido ascórbico, vitamina E, ferritina, ceruloplasmina, polifenoles, antocianinas (Guija et al., 2015).

2.3.4.1. Antioxidantes naturales

Actualmente existen diversos estudios epidemiológicos que vinculan la ingesta de una dieta rica en frutas y verduras con un disminuido riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, cáncer, aterosclerosis, artritis, etc., y ello debido a que dichos alimentos tienen un elevado contenido de polifenoles, flavonoides, antocianinas, vitamina C, vitamina E, β -caroteno, licopeno (Riccioni et al., 2007 y Paredes et al., 2010).

Se conocen que las sustancias naturales son más inocuas que las realizadas por síntesis y es así que se está buscando en las fuentes naturales nuevas sustancias con propiedades antioxidantes que puedan reemplazar a los antioxidantes sintéticos. Entre los antioxidantes sintéticos más usada en la industria alimentaria que estabilizan y protegen las grasas vegetales y animales tenemos al Butil hidroxitolueno

(BHT), Butil hidroxianisol (BHA), Terbutil hidroquinona (TBHQ) y el Galato de propilo (PG) (Shahidi et al., 1992; International Life Sciences Institute, 1996).

Las plantas superiores tienen un alto contenido de antioxidantes, como vitamina C, vitamina E, vitamina B, carotenos, flavonoides entre otros, compuestos que tienen la propiedad de reaccionar con los radicales libres y evitar de esta manera el efecto nocivo que puedan causar a las células (Cao y Prior, 2000).

2.3.4.2. Actividad antioxidante de aceites esenciales

Los aceites esenciales poseen actividad antioxidante. Los terpenos fenólicos, ácido camosoico, camosol, rosmarindifenol y rosmarinquinona componentes del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* y *Salvia officinalis* muestran actividad antioxidante (García BL, 2001; Ruberto G, 2000)

Los aceites esenciales a través de numerosas investigaciones están demostrando que tiene actividad antioxidante, así, en un estudio sobre la actividad antioxidante in vitro de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L.(orégano), *Rosmarinus officinalis* L.(romero) y *Coriandrum sativum* L.(cilantro), en emulsiones de agua en aceites (Ag/Ac) y aceite de agua (Ac/Ag), sometidas al deterioro oxidativo por medio de la radiación ultravioleta, se demostró que en la emulsión de Ag/Ac, el aceite esencial de orégano presentó actividad antioxidantes superior a la del cilantro y el romero, e incluso a la de la vitamina E y así mismo; el aceite esencial de orégano presentó una acción protectora más baja en la emulsión de Ac/Ag (Tafur, 2005).

2.3.4.3. Estrés oxidativo y antioxidante

Cuando la defensa antioxidante es insuficiente para proteger al organismo del efecto dañino de los radicales libres puede conducirlo al estrés oxidativo, condición que está estrechamente vinculada a una gran diversidad de patologías como la psoriasis, cáncer, diabetes mellitus, aterosclerosis, cataratas, hipertensión arterial (Lee et al., 2004 y Pharm-Huy et al., 2008).

El estrés oxidativo ocurre cuando el balance de reacciones pro-oxidantes y antioxidantes es alterado por un exceso de EROs. Este desbalance tiene consecuencias citopatológicas que incluyen modificaciones en las proteínas, lípidos y ADN, produciendo lipoperoxidación, oxidación de los grupos sulfhidrilos de las proteínas y fragmentación o formación de enlaces covalentes cruzado en las ribonucleoproteínas, entre otros.

Las causas de este desbalance pueden ser de origen interno y externo. El ambiente de la mayor parte de los organismos no suele ser constante, todo organismo cuenta entonces con un potencial de defensa que le permite resistir a los estresores del medio ambiente.

Los diversos agentes estresantes pueden ser químicos, físicos y biológicos. En el caso de los químicos pueden ser orgánicos o inorgánicos, tienen diferentes modos de acción, pero los diversos agentes suelen tener un efecto común: su asociación al daño oxidativo en las células.

Las respuestas del organismo a estas injurias involucran una serie de estrategias como la regulación de proteínas antioxidantes (superóxido dismutasas, peroxidasas, catalasa, glutatión peroxidasa), enzimas de reparación de daños oxidativos (metionina sulfóxido dismutasas).

También forma parte de las estrategias, un grupo de biomoléculas de bajo peso molecular. Estas biomoléculas son de tipo endógenas

(glutatión, ácido úrico, bilirrubina en el hombre) y exógenas (oxigenados como los polifenoles, a este grupo pertenecen los flavonoides, ácido ascórbico, tocoferoles; nitrogenados como algunos alcaloides y algunos azufrados) generalmente de fuente vegetal con capacidad antioxidante (Baud, 2004)

2.3.5. *Candida albicans*

2.3.5.1. Género *Candida*

Existen unas 200 especies de *Candida*, sólo 10 se han descrito asociados a enfermedades. En 80% de los casos, sigue siendo el microorganismo predominante en las infecciones. La más frecuente, es *Candida albicans*, que supone entre el 60 – 80% del total causante de la enfermedad. (Sádaba et al., 2004).

Las infecciones por especies del género *Candida* y especialmente por *Candida albicans*, han aumentado en las últimas tres décadas. La zona más frecuentemente afectada son los pliegues cutáneos donde la humedad crea un hábitat adecuado para su supervivencia. Se puede manifestar como: intertrigo de grandes pliegues, erosión interdital, candidiasis del pañal, foliculitis, onicomycosis candidiásica con parinoquia y perionixis (Kim, 2011).

Las especies de *Candida* crecen bien en medios de cultivo con agar, peptona, dextrosa, maltosa o sacarosa, Agar Sabouraud.

2.3.5.2. Descripción de la especie *Candida albicans*

La *Candida albicans* normalmente se encuentra en pequeñas cantidades en la vagina, boca, tracto digestivo y en la piel. Bajo circunstancias normales no causa ningún daño, vive en equilibrio con las otras bacterias en el cuerpo. Su crecimiento está controlado por las defensas del cuerpo

(Sistema inmune; que ayuda a regular el equilibrio ácido) y por los demás miembros de la flora. Una dieta sana es la clave para prevenir infecciones denominadas candidiasis que se presenta bajo diversas formas clínicas: digestiva, neumonías, fungemias, endocarditis. También puede ser dañino si se encuentra en otras partes tales como: La vagina, ingle, oídos, debajo de las uñas, dobleces de la piel, cavidades de los dientes y en la zona digestiva. (Lobos, 1997)

La *Candida albicans* suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas; sin embargo, se han identificado formas filamentosas de longitud variable(Volk et al., 1989 y Webb et al., 1998). La pared celular compuesta principalmente por los polisacáridos: Manán, Glucán y Quitina (Pierce et al., 1978). La membrana citoplasmática es una estructura que reviste gran importancia, está presenta una doble capa de lípidos y posee invagaciones. Además contiene las enzimas responsables de la síntesis de la pared celular (Pardi y Cardozo, 2002).

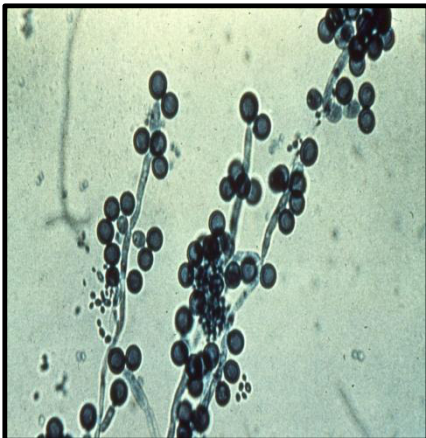


Figura 5. *Candida albicans*
Levaduriforme



Figura 6. *Candida albicans*
filamentosa

Fuente. Imágenes tomadas de Lozano Chiu (1994)

2.3.5.3. Actividad antifúngica de aceites esenciales

En un estudio sobre la evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* sobre *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* y *Candida albicans*; se demostró que tiene esta actividad, debido posiblemente a la presencia de compuestos químicos fenólicos como el timol y el carvacrol en su composición química (Anchante, 1998). El aceite esencial obtenido de *Zingiber officinali* "jengibre" basado en su composición química de monoterpenos y sesquiterpenos, se estimó que puede ejercer una acción antimicrobiana sobre algunos microorganismos como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus faecalis* (Vásquez, 2001).

Al realizar el estudio del *Eucalyptus globulus* "eucalipto" se obtiene aceite esencial, extractos e infusiones con actividad antifúngica, a concentraciones entre el 54% y el 95% del componente activo 1,8-cineol (World Health Organization, 2002).

De la Cruz P. (2012) reportó que los aceites esenciales de las especies *Piper Carpunya* (Carpundia), *Piper lineatum* (Matico) y *Piper acutifolium* (Matico rojo) tiene propiedades antimicóticas y antimicrobianas.

El aceite esencial de *Minthostachys mollis* "muña" demostró actividad antimicótica in vitro frente a las cepas de *Candida albicans* a las concentraciones de 50 y 100 por ciento y frente a los dermatofitos *Microsporum canis*, *trichophytom mentagrophytes* y *Trichophytom tonsurans*; son sensibles en los volúmenes de 5 y 50 mL; encontrándose en el aceite esencial los siguientes componentes químicos: Pulegona, mentona y limoneno (Cano, 2007).

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1 Materiales, Reactivos y Equipos

3.1.1. Materiales

- Embudo de decantación
- Embudo simple
- Probeta florentino
- Tubos de ensayo
- Vaso Beaker
- Fiolas
- Microplacas
- Placas Petri
- Cubeta espectrofotométrica
- Micropipetas

3.1.2. Reactivos

Fueron adquiridos de las casas Merck y Sigma

- Agua destilada
- Metanol
- Etanol
- n-hexano
- Butanol
- Sulfato de sodio anhidro
- Trolox: Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico
- DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
- ABTS^{•+} : 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
- Persulfato de potasio
- Agar dextrosa Sabouraud

- Escala de Mac Farland
- Dimetilsulfóxido (DMSO)

3.1.3. Equipos

- Balanza analítica Mettler. Sensibilidad 0,1 mg
- Potenciómetro Orion. Modelo SA720
- Picnómetro de 1 mL.
- Refractómetro Carl Seizz. Modelo 74078
- Hidroextractor de destilación de acero inoxidable
- Cromatógrafo de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM) marca SHIMADZU , modelo SHIMADZU GC-2010 Plus
- Espectrofotómetro: Espectro UV. VIS Double Beam PC.
- Estufa Memmert

3.1.4. Material biológico

Hojas frescas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”

3.1.5 Microorganismo de ensayo

Candida albicans ATCC 10231

3.2. Instituciones donde se ejecutó la investigación

La obtención del aceite esencial y el análisis preliminar, se realizó en el Laboratorio de Química Orgánica, del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. El análisis fisicoquímico se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisicoquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. La elucidación de los componentes químicos del aceite esencial se realizó en el Laboratorio LABICER de la Facultad de Ciencias de la Universidad

Nacional de Ingeniería. La investigación de la actividad antioxidante se efectuó en el Laboratorio de Química Orgánica, del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. El estudio de la determinación antifúngica se realizó en el Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.

3.3. Tipo y diseño de la investigación

El presente trabajo de investigación pertenece al tipo analítico, experimental, prospectivo y longitudinal.

3.4. Diseño del trabajo experimental

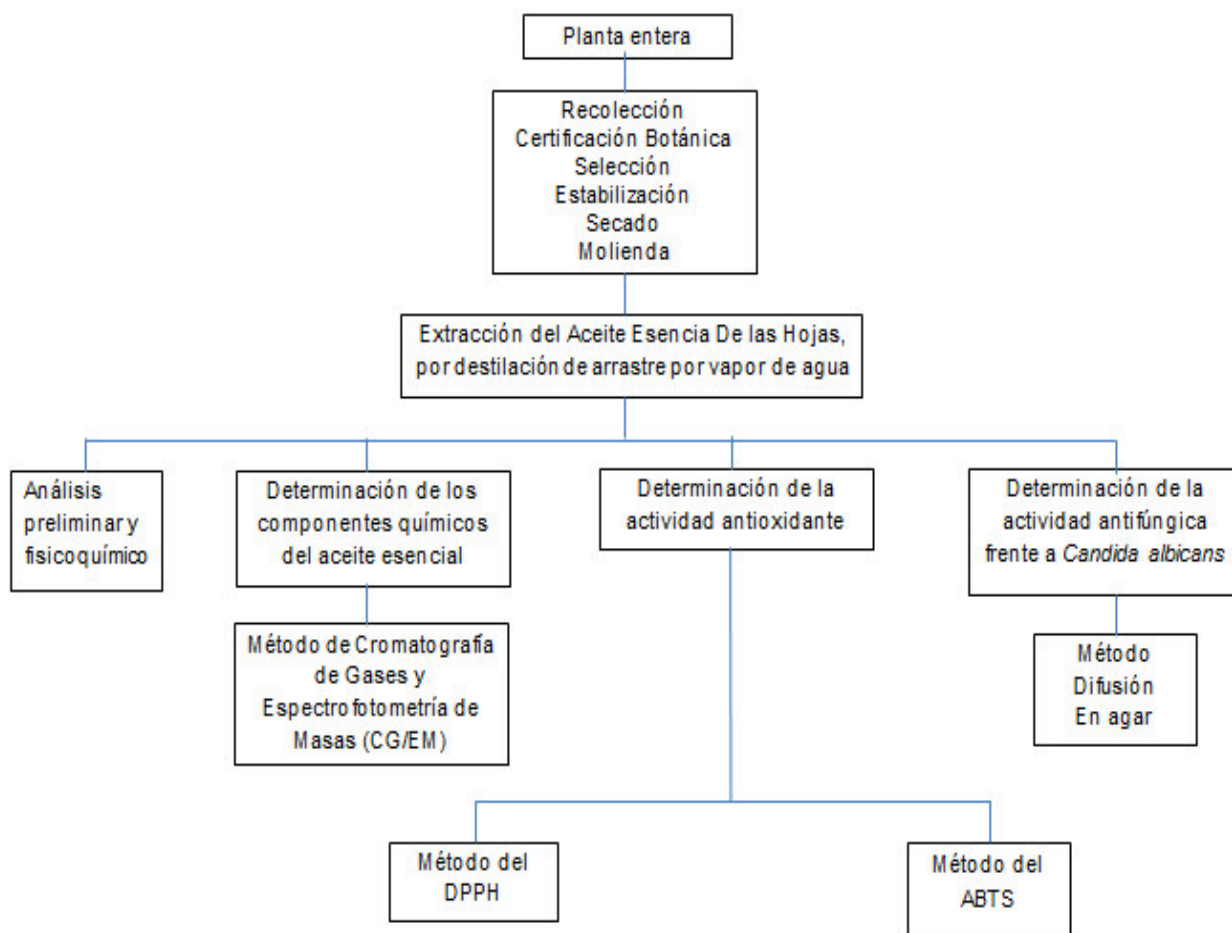


Figura 7. Flujograma del trabajo experimental

3.4.1. Colecta y clasificación taxonómica de la especie vegetal

Las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” fueron recolectadas en el distrito de Huacaschuque, provincia de Pallasca, capital Cabana, región Ancash ubicada a 3100 metros de altitud, durante el mes de Diciembre del 2014. La clasificación taxonómica se realizó en el Museo de Historia Natural de la UNMSM.

3.4.2. Procesamiento de la muestra

Las hojas se desecaron bajo sombra a temperatura ambiente promedio 20 °C, en el distrito de Huacaschuque, provincia de Pallasca, capital Cabana, región Ancash, durante 08 días, hasta obtener una muestra seca que fácilmente se trituró al frotar con la mano, luego se les colocó dentro de bolsas de papel kraft para su traslado a Lima.

3.4.3. Obtención del aceite esencial

A 5 Kg de hojas secas fueron tratadas en un equipo de acero inoxidable y sometido a destilación por arrastre de vapor de agua. El destilado se separó tomando en cuenta sus propiedades de inmiscibilidad y diferencia de densidades entre el agua y el aceite esencial, utilizando una pera de separación, se deshidrató las impurezas de agua en el aceite esencial con sulfato de sodio anhidro grado reactivo, con posterior filtración y conservación del aceite esencial en un frasco de vidrio de color ámbar bajo refrigeración a una temperatura de 4°C.

3.4.4. Rendimiento del aceite esencial

Para la determinación del rendimiento se realizó con el volumen de destilado del aceite esencial obtenido en la probeta florentino. Por el método gravimétrico-volumétrico se determinó el porcentaje de Rendimiento de Aceite Esencial (%RAE) con la siguiente expresión:

$$\%RAE = \text{Vol. AE(mL)} / P_{\text{muestra}} \text{ (g)} \times 100$$

Donde:

Vol. AE: Volumen del aceite esencial obtenido en mililitros.

P_{muestra}: Peso de la muestra a destilar en gramos.

3.4.5. Análisis preliminar y fisicoquímico

Se realizó el análisis organoléptico y la solubilidad del aceite esencial utilizando diversos solventes orgánicos. Asimismo, se realizó el análisis fisicoquímico determinándose las principales constantes físicas: densidad por picnometría, pH por potenciometría, índice de refracción por refractometría. se realizaron por triplicado según las técnicas estandarizadas de la Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, 20th Edition (2016)

3.4.6. Determinación de los componentes químicos del aceite esencial

Para la separación e identificación de los componentes químicos, se utilizó un Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas (CG/EM) SHIMADZU , modelo : SHIMADZU, GC-2010 Plus; en las siguientes condiciones: Columna RESTEK, RTX-5MS 30 m de largo; 0,25 mm de diámetro interno; tamaño de poro 0,25 µm, temperatura inicial 60°C, con un tiempo de espera de 60 minutos para llegar a una temperatura final 230° C, la temperatura de inyección: 250 °C, volumen de inyección: 10 µL. El gas Carrier utilizado fue el Helio. La detección y elucidación de los componentes químicos fue por comparación con los estándares de espectros de masas de las respectivas bibliotecas. Esta técnica es muy común para la

determinación química de aceites esenciales (Masada, 1997; Soto et al., 2013).

3.4.7. Determinación de la actividad antioxidante

Se realizó utilizando el método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y el método de captación del radical ABTS^{•+} (2,2-azinobis[3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato])

3.4.7.1 Método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Joyeux, 1995)

El 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) es un radical libre estable, presenta una coloración púrpura con absorbancia a 517 nm. Las sustancias atrapadoras de radicales libres (donadores de H) reaccionan con este compuesto y producen la desaparición del color. La reacción es seguida midiendo la disminución de la absorbancia a 517 nm. Los resultados se pueden expresar como IC₅₀, % de inhibición, % de actividad antirradicalaria o equivalentes a Trolox o a vitamina C.

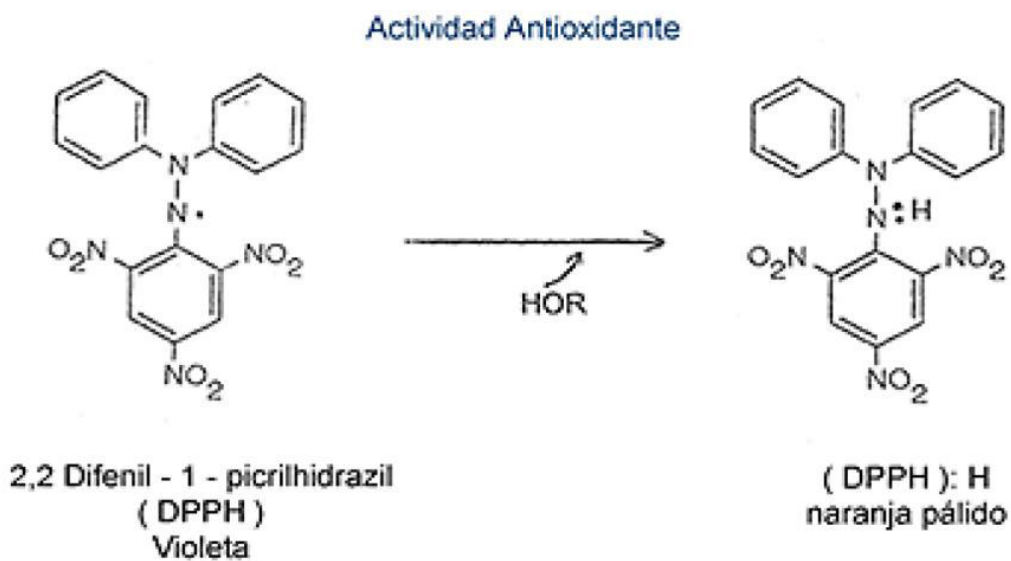


Figura 8. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante

Fuente: Imagen tomada de Alam (2012)

Preparación de la muestra

- a) Se preparó las diluciones del aceite esencial de panizara a las siguientes concentraciones: 163; 326; 652; 1000; 1666,667 y 2333,333 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Preparación de la solución de DPPH

Se preparó una solución de DPPH (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$.) en metanol, se midió su absorbancia a 517nm ajustando esta entre 0,600 y 0,700.

la solución se guardó en un frasco de vidrio ámbar y en refrigeración.

Preparación de la solución de Trolox

Se preparó una solución hidroalcohólica de Trolox a una concentración 36 µg/mL, a partir de esta solución inicial se procedió a preparar diluciones con las siguientes concentraciones: 10,0; 7,2; ,3,6 y 1,2 µg/mL.

Procedimiento

- a) Se calibró el espectrofotómetro con un blanco que contenía 400 µL de etanol absoluto y 800 µL de metanol.
- b) Se colocó en un tubo de ensayo 400 µL del aceite esencial de panizara a las diferentes concentraciones preparadas y 800 µL de la solución de trabajo de DPPH.
- c) Se dejó en reposo durante 30 minutos alejado de la luz.
- d) Las absorbancias se leyeron en un espectrofotómetro de luz UV-Visible a una longitud de onda de 517 nm.
- e) Se prepara una curva patrón del Trolox.

Además, se realizó un control de DPPH en donde se reemplazó el aceite esencial de panizara por su solvente (etanol). Cada ensayo se realizó por triplicado.

Tabla 1. Preparación de los tubos para el ensayo del DPPH

	Blanco	Control	Muestra	Trolox
Metanol(mL)	0,8	-	-	-

Solvente A.E. Etanol (mL)	0,4	0,4	-	-
A.E. Panizara (mL)	-	-	0,4	-
Trolox (mL)	-	-	-	0,4
DPPH (mL)	-	0,8	0,8	0,8

El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%Inhibición = \frac{(Abs. del control - Abs. de la muestra problema)}{Abs. del control} \times 100$$

*Abs= Absorbancia

3.4.7.2.- Método de captación del radical ABTS^{•+} (2,2-azinobis[3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato]) (Re,1999)

El radical ABTS^{•+} es preparado por la oxidación del ABTS con persulfato de potasio. La formación del radical está centrado en el nitrógeno exhibe un intenso color verde.

Cuando se coloca frente a una sustancia estabilizadora de radical libre, el radical ABTS^{•+} se decolora. Al igual que el DPPH es útil para muestras de variada polaridad. Su máximo de absorbancia es a 734 nm.

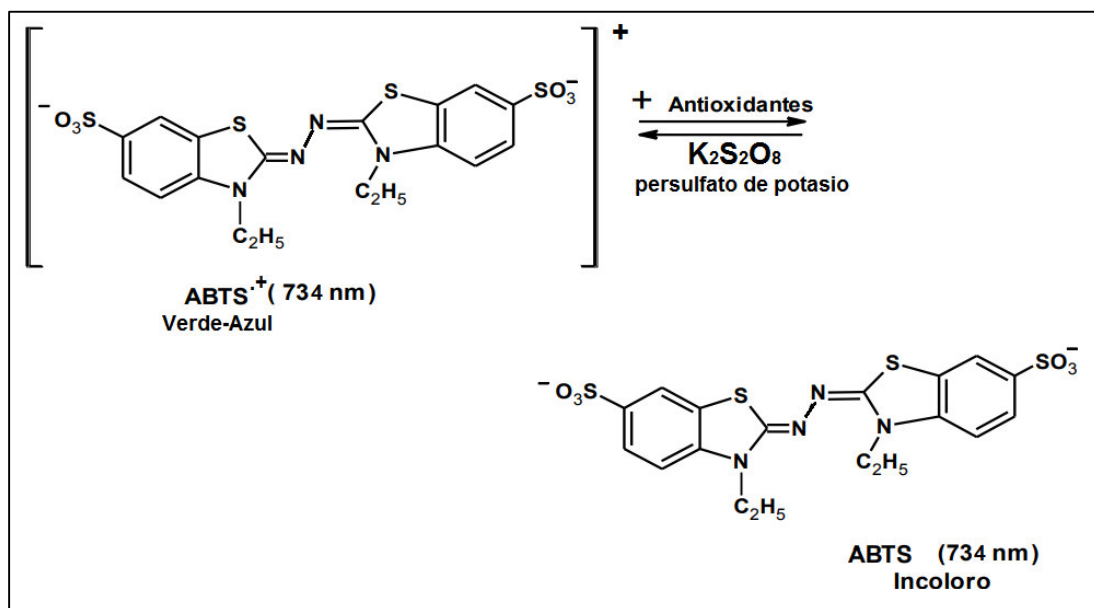


Figura 9. Estructura del $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (antes y después de la reacción con el antioxidante)

Fuente. Imagen tomada de Zuleta et al (2009)

Preparación de la muestra

- a) Se preparo las diluciones del aceite esencial de panizara a las siguientes concentraciones: 2,5; 5,0; 10,0 y 20,0 $\mu\text{g/mL}$.

Procedimiento

- a) Preparación del reactivo: se realizó la activación del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, preparando una solución acuosa stock de ABTS 7 mM y añadiéndole persulfato de potasio para una concentración final de 2,45 mM.
- b) Se deja reaccionar durante 16 horas a temperatura ambiente y en oscuridad.

- c) Luego de la activación, se diluye con etanol hasta obtener una absorbancia de $0,70 \pm 0,05$ a 734 nm.
- d) A un volumen de 180 μL de la dilución del radical ABTS^{•+} se le adiciona 20 μL de la muestra de aceite esencial y se incuba a temperatura ambiente durante 7 minutos en la oscuridad.
- e) Transcurrido este tiempo se determina espectrofotométricamente la desaparición del radical ABTS^{•+} a 734 nm en el espectrofotómetro de luz UV

3.4.8. Evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial frente a *Candida albicans*

Se empleó el Método de difusión en Agar.

Método de Difusión en agar (Rojas, 2003)

Fundamento

Esta prueba se basa en la inhibición del crecimiento fúngico, mediante la difusión de las sustancias activas en un medio sólido y se evidencia por la formación de halos claros alrededor de las colonias.

Microorganismo

Candida albicans ATCC 10231, del laboratorio de Microbiología del Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

Muestra

Aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” en concentraciones de 100; 75; 50 y 25 por ciento. Utilizando como diluyente alcohol etílico de 96°.

Preparación del inóculo

Para la preparación de la suspensión del inóculo, se utilizó a la *Candida albicans* crecidos en agar dextrosa Sabouraud por 48 h. Luego se suspende al microorganismo en solución salina 0,85% estéril y se ajusta la turbidez al equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland.

Preparación e inoculación de las placas

El medio agar dextrosa de Sabouraud previamente reconstituido, esterilizado, enfriado y mantenido a 45 °C, se procede a inocular con 1 mL de suspensión del inóculo (1×10^6 ufc/mL) por cada 100 mL de medio de cultivo, homogenizado y distribuido en placas Petri de vidrio estéril de 90 mm de diámetro. Se deja solidificar y se rotula con el nombre del microorganismo. Finalmente se hace pozos con la ayuda de un sacabocado de acero de 11 mm de diámetro externo, en cada placa se hizo 2 ó 3 pozos equidistantes.

Inoculación e incubación de la muestra

Se procederá a colocar 100 μ L del aceite esencial en las concentraciones señaladas anteriormente en los pozos, se deja reposar por 30 minutos a temperatura ambiente y se lleva a incubación a 37°C por 24 horas.

Control negativo

Se utilizó etanol 96°

Control positivo

Se utilizó discos de susceptibilidad con nistatina 0,2 µg

Lectura e interpretación de los resultados

Se observa las zonas claras de inhibición del crecimiento (halos) y se mide los diámetros en mm. Se considera que tiene una actividad antifúngica significativa a un halo de inhibición mayor a 18mm.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Extracción del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”

Con la aplicación del método de destilación con arrastre de vapor de agua, se obtuvo un rendimiento de 0,58 mL %v/p.

4.1.2. Análisis preliminar y constantes fisicoquímicas (ver tabla 2)

Tabla 2. Análisis preliminar y constantes físicas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”

DETERMINACIONES	RESULTADOS
Análisis organoléptico	Líquido oleoso, ligeramente amarillo, aromático, agradable y altamente volátil
Solubilidad	Insoluble en agua, ligeramente soluble en metanol, soluble en etanol, n-hexano y éter etílico.
Constantes físicas	Densidad (21°C): 0,978 pH (21°C): 5,60 Índice de refracción(21°C):1,475

4.1.3. Determinación de la composición química del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”

En el análisis del aceite esencial realizado por Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM), se identificó 44 componentes químicos que se presentan en la figuras 10, 11, 12 y tablas 3 y 4.

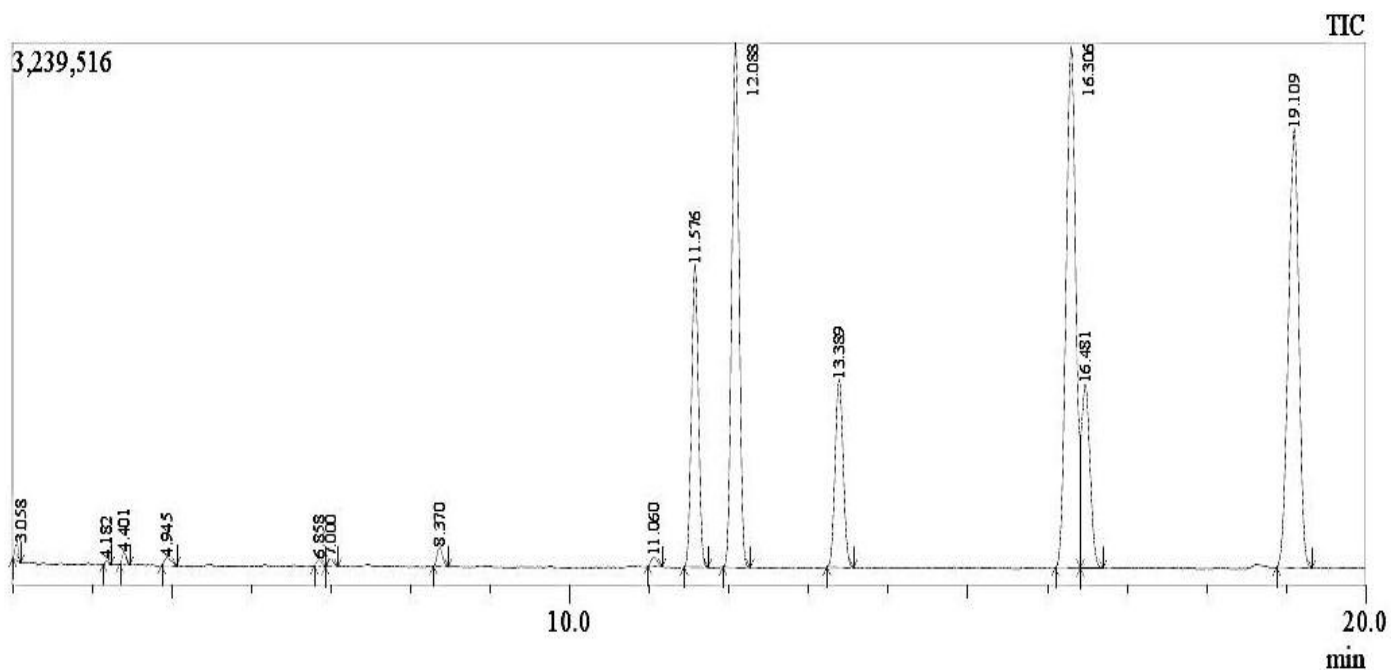


Figura 10. Primera parte del Cromatograma de Gas del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” de 3 a 20 minutos

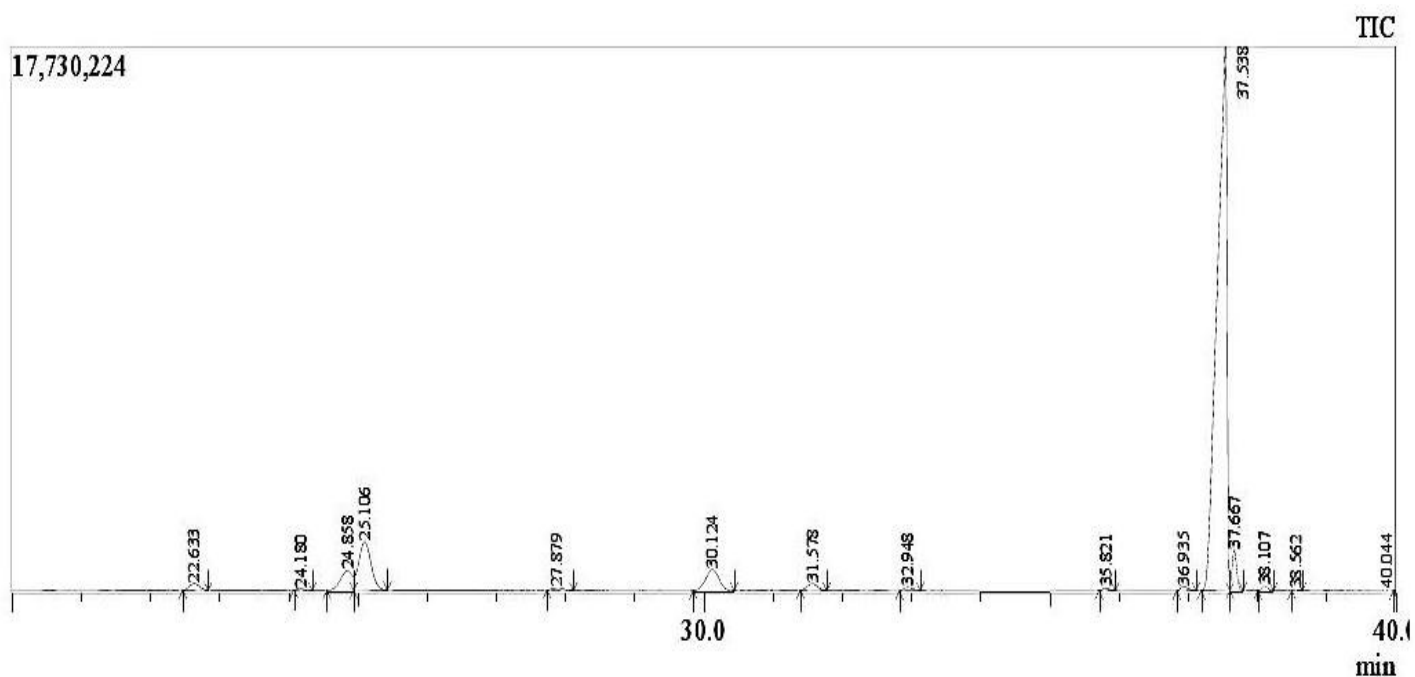


Figura 11. Segunda parte del Cromatograma de Gas del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts "panizara" de 20 a 40 minutos

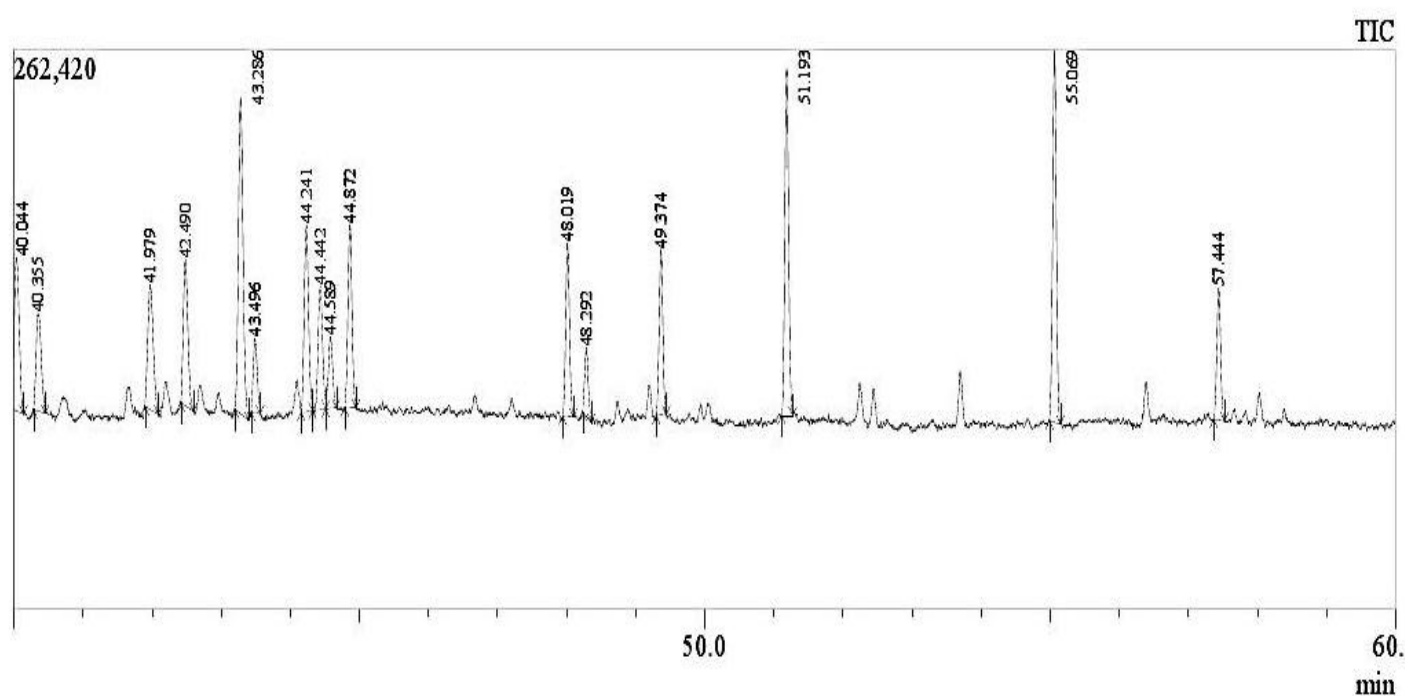


Figura 12. Tercera parte del Cromatograma de Gas del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts "panizara" de 40 a 60 minutos

Tabla 3. Primera parte de la composición química del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” determinado por Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM)

COMPONENTES QUÍMICOS	Tiempo de Retención T.R (minutos)	Altura	Altura %
2-Etil furano	3,058	100455	0,27
2,5-Norbornadieno	4,182	23584	0,06
2-Metil butanoato de metilo	4,401	72198	0,19
2,4-Dimetil hexano	4,945	49307	0,13
2-Metil butanoato de etilo	6,858	42290	0,11
3-Metil butanoato de etilo	7,000	50664	0,13
Acetato de (2-metil) butilo	8,370	115915	0,31
1,7,7-trimetil Triciclo [2.2.1.0(2,6)] heptano	11,060	56421	0,15
2-metil-5-(1-metiletil) biciclo [3.1.0] 2-hexeno	11,576	1805474	4,80
Alfa-pineno	12,088	3130204	8,32
Canfeno	13,389	1120270	2,98
Beta-felandreno	16,306	3113037	8,27
Beta-pineno	16,481	1097395	2,92
Beta-mirceno	19,109	2621874	6,96
1-Metil-4-(1-metiletilideno) ciclohexeno (terpinoleno)	22,633	215551	0,57
O-cimeno	24,180	37016	0,10
D-Limoneno	24,858	647142	1,72
Eucaliptol	25,106	1592590	4,23
trans-beta-Ocimeno	27,879	84420	0,22
3,7-dimetil- 1,3,6-octatrieno (Z-ocimeno)	30,124	687356	1,83
gamma-Terpineno	31,578	218128	0,58
2-metil-5-(1-metiletil)-, (1.alfa.,2.alfa.,5.alfa) biciclo [3.1.0] 2-hexanol	32,948	115002	0,31
2-Careno	35,821	83842	0,22

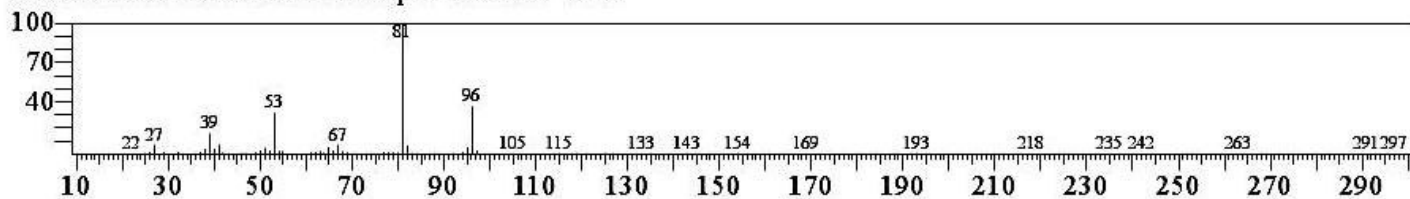
Tabla 4. Segunda parte de la composición química del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” determinado por Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM)

COMPONENTES QUÍMICOS	Tiempo de Retención T.R (minutos)	Altura	Altura %
2-metil-5-(1-metiletil)-(1.alfa.,2.beta.,5.alfa) biciclo [3.1.0] 2-hexanol	36,935	138015	0,37
1,3,3-trimetil-2-etenil ciclohexeno	37,538	17631090	46,84
Linalool	37,667	1309503	3,48
2-metil butanoato de (2-metil) butilo	38,107	158812	0,42
3-metil butanoato de (2-metil) butilo	38,562	39370	0,10
acetato de 3-octilo	40,044	71801	0,19
6,6-dimetil- 2-metileno-[1S-(1.alfa.,3.alfa.,5.alfa)] Biciclo [3.1.1] 3-heptanol	40,355	45852	0,12
Citronelal	41,979	58658	0,16
Endo-borneol	42,490	68712	0,18
Terpinen-4-ol	43,286	148279	0,39
4-metil-1-(1-metiletil) ciclohexeno (p-menteno)	43,496	35138	0,09
alfa-terpineol	44,241	88030	0,23
6,6-dimetil biciclo [3.1.1] 2-hepten-2-carboxaldehído	44,442	58615	0,16
6,6-dimetil biciclo [3.1.1] 2-hepten-2-ol	44,589	34011	0,09
4-(1-metiletil) benzaldehído (cuminaldehído)	44,872	85912	0,23
Acetato de linalilo	48,019	81757	0,22
3,7-dimetil-6-en octato de metilo	48,292	32516	0,09
Acetato de bornilo	49,374	77842	0,21
3,7-dimetil-2,6-dien octato de metilo (Geranato de metilo)	51,193	163103	0,43
Cariofileno	55,069	174553	0,46
Germacreno D	57,444	62004	0,16

4.1.4 Espectros de los componentes químicos del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”

<< Target >>

Line#:1 R.Time:3.060(Scan#:13) MassPeaks:130
RawMode:Averaged 3.055-3.065(12-14) BasePeak:81.00(42306)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:1430 Library:NIST14s.lib
SI:95 Formula:C6H8O CAS:3208-16-0 MolWeight:96 RetIndex:742
CompName:Furan, 2-ethyl- \$\$ Furan, .alpha.-ethyl- \$\$ 2-Ethylfuran \$\$

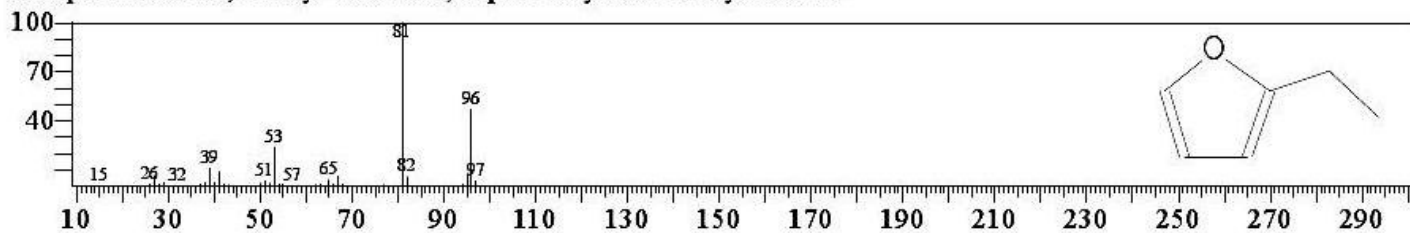
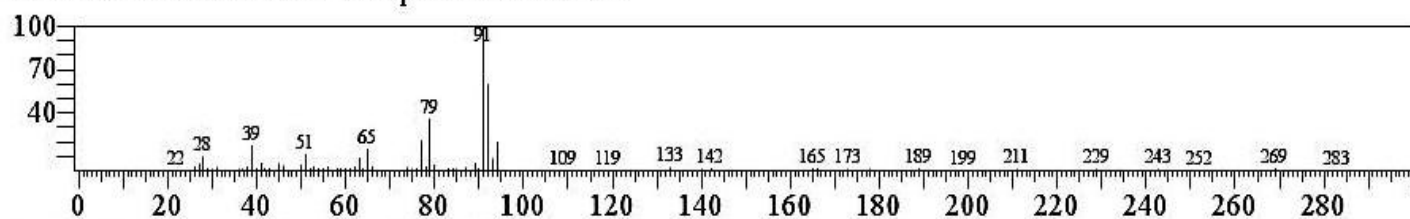


Figura 13. Espectro de la estructura del 2-etil furano

<< Target >>

Line#:2 R.Time:4.180(Scan#:237) MassPeaks:126
 RawMode:Averaged 4.175-4.185(236-238) BasePeak:91.05(6566)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:4 Entry:1278 Library:NIST14s.lib

SI:83 Formula:C7H8 CAS:121-46-0 MolWeight:92 RefIndex:706

CompName:2,5-Norbornadiene \$\$ Bicyclo[2.2.1]hepta-2,5-diene \$\$ Bicyclo[2.2.1]heptadiene \$\$ Norbornadiene \$\$ 3,6

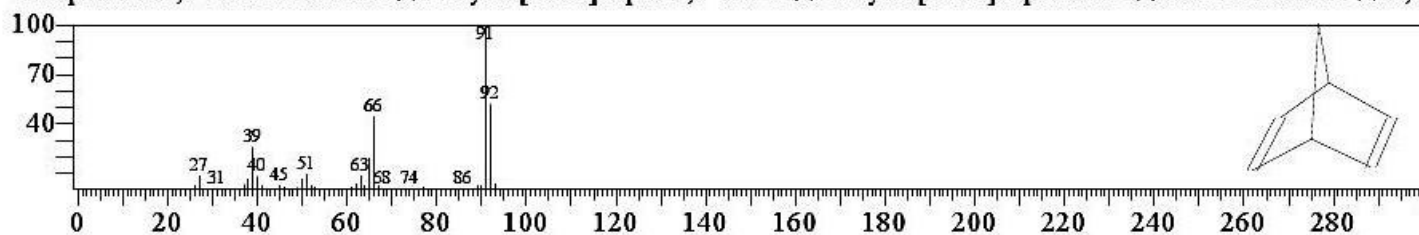
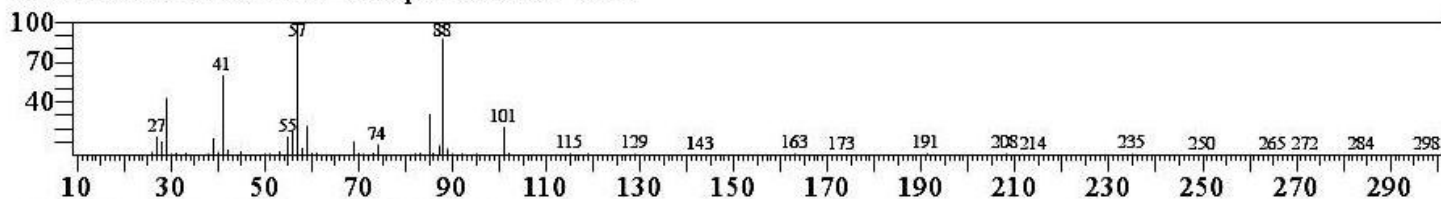


Figura 14. Espectro de la estructura 2,5-norbornadieno

<< Target >>

Line#:3 R.Time:4.400(Scan#:281) MassPeaks:158
 RawMode:Averaged 4.395-4.405(280-282) BasePeak:57.05(14609)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:3721 Library:NIST14s.lib

SI:94 Formula:C6H12O2 CAS:868-57-5 MolWeight:116 RefIndex:721

CompName:Butanoic acid, 2-methyl-, methyl ester \$\$ Butyric acid, 2-methyl-, methyl ester \$\$ Methyl .alpha.-methylbu

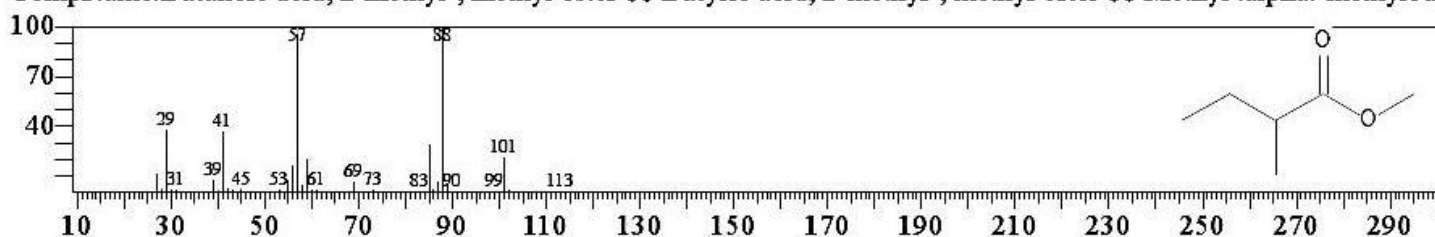
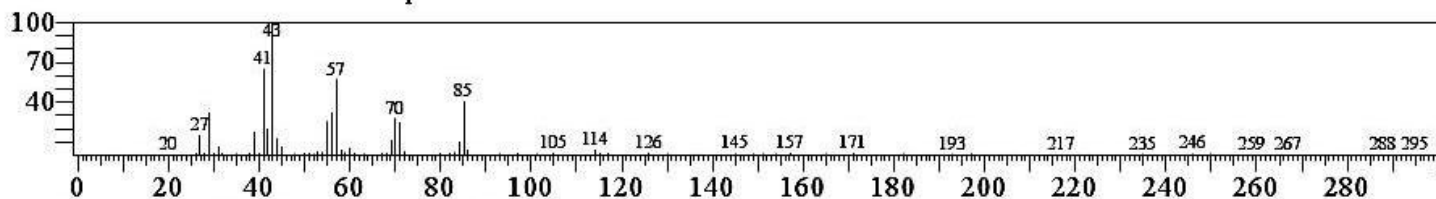


Figura 15. Espectro de la estructura del 2-metil butanoato de metilo

<< Target >>

Line#:4 R.Time:4.945(Scan#:390) MassPeaks:164
 RawMode:Averaged 4.940-4.950(389-391) BasePeak:42.95(9009)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:3466 Library:NIST14s.lib
 SI:90 Formula:C8H18 CAS:589-43-5 MolWeight:114 RefIndex:688
 CompName:Hexane, 2,4-dimethyl- \$\$ 2,4-Dimethylhexane \$\$

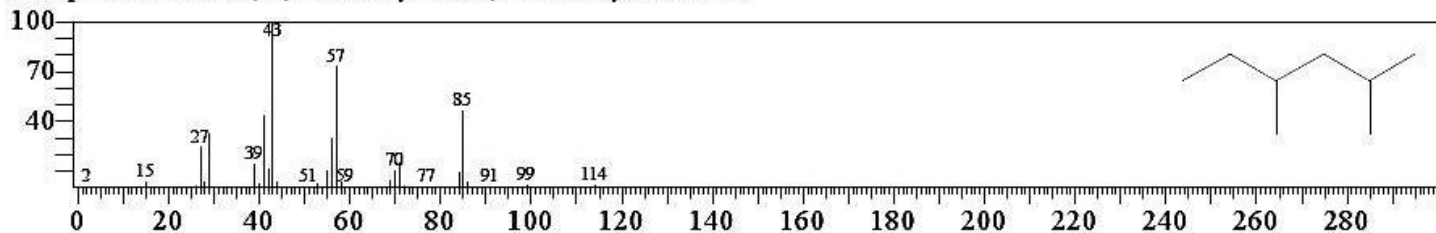
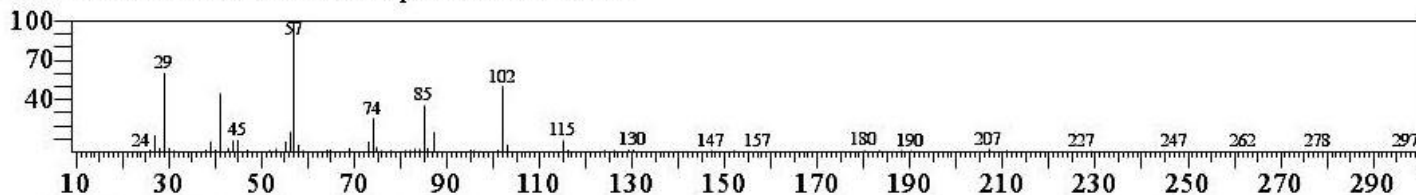


Figura 16. Espectro de la estructura del 2,4-dimetil hexano

<< Target >>

Line#:5 R.Time:6.860(Scan#:773) MassPeaks:152
 RawMode:Averaged 6.855-6.865(772-774) BasePeak:57.05(9529)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:5687 Library:NIST14s.lib
 SI:94 Formula:C7H14O2 CAS:7452-79-1 MolWeight:130 RefIndex:820
 CompName:Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester \$\$ Butyric acid, 2-methyl-, ethyl ester \$\$ Ethyl .alpha.-methylbutyrate

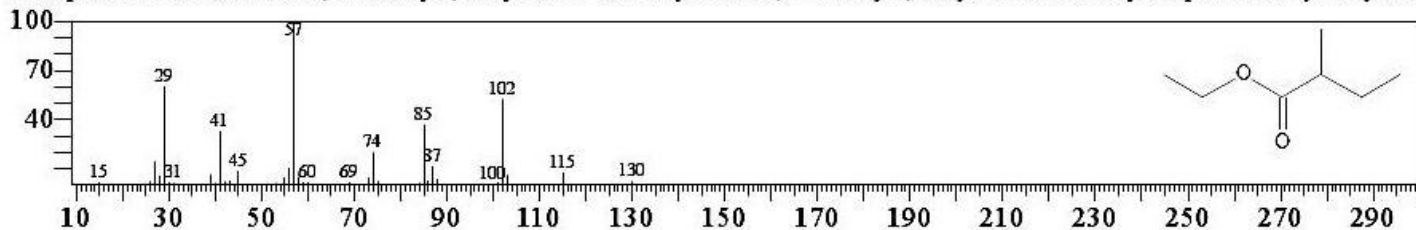
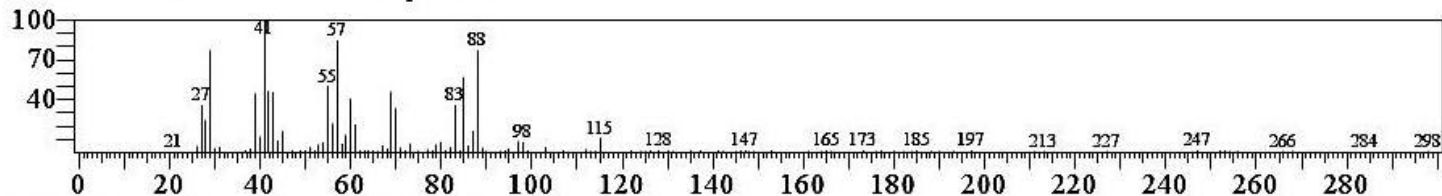


Figura 17. Espectro de la estructura del 2-metil butanoato de etilo

<< Target >>

Line#:6 R.Time:7.000(Scan#:801) MassPeaks:178
 RawMode:Averaged 6.995-7.005(800-802) BasePeak:40.95(4859)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:5635 Library:NIST14s.lib

SI:82 Formula:C7H14O2 CAS:108-64-5 MolWeight:130 RetIndex:820

CompName:Butanoic acid, 3-methyl-, ethyl ester \$\$ Isovaleric acid, ethyl ester \$\$ Ethyl isovalerate \$\$ Ethyl 3-methylbu

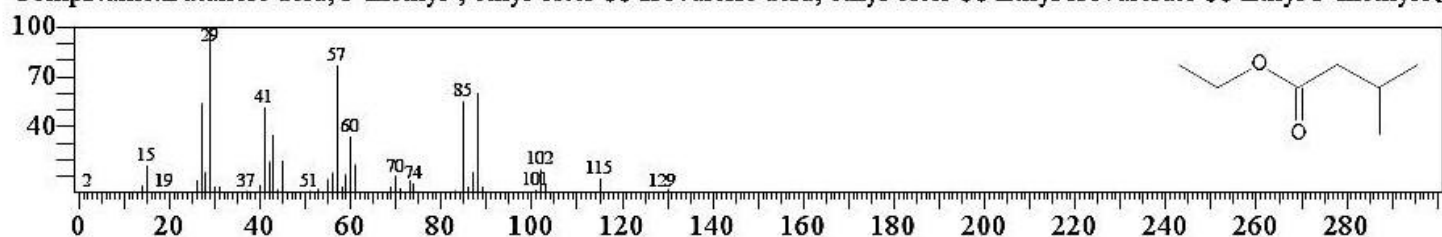
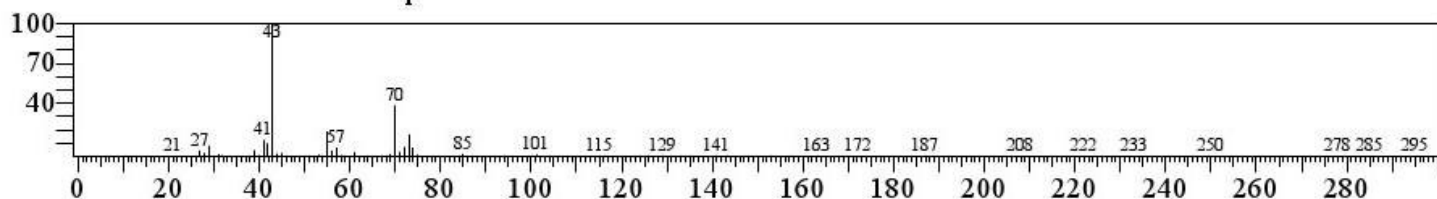


Figura 18. Espectro de la estructura del 3-metil butanoato de etilo

<< Target >>

Line#:7 R.Time:8.370(Scan#:1075) MassPeaks:153
 RawMode:Averaged 8.365-8.375(1074-1076) BasePeak:42.95(45304)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:5654 Library:NIST14s.lib

SI:95 Formula:C7H14O2 CAS:624-41-9 MolWeight:130 RetIndex:820

CompName:1-Butanol, 2-methyl-, acetate \$\$ 2-Methyl-1-butyl acetate \$\$ 2-Methylbutyl acetate \$\$ Acetic acid 2-methyl

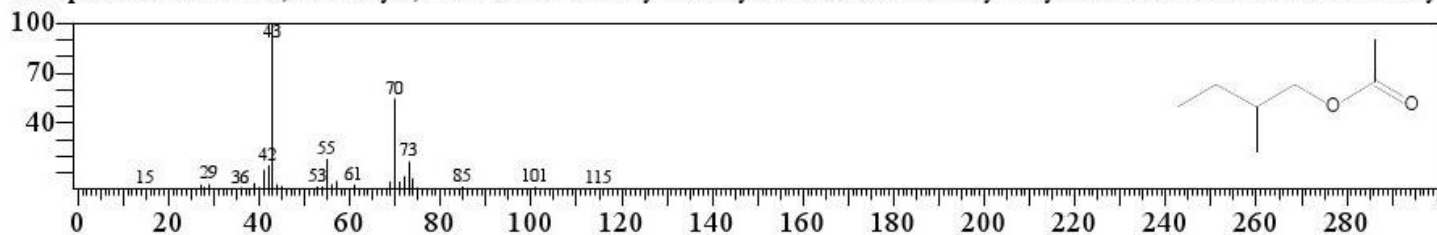


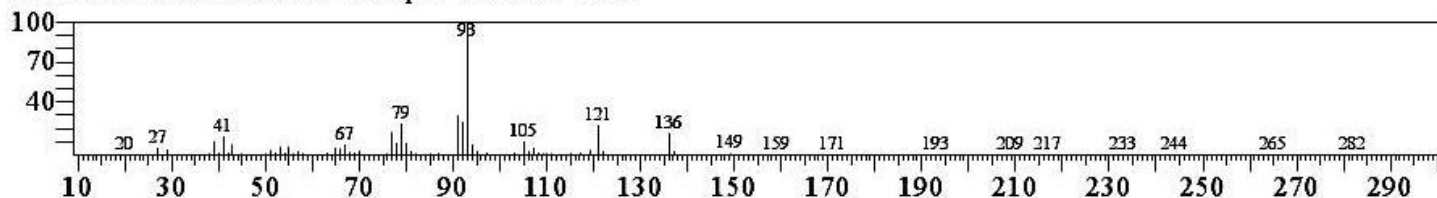
Figura 19. Espectro de la estructura del acetato de (2-metil) butilo

<< Target >>

Line#:8 R.Time:11.060(Scan#:1613) MassPeaks:158

RawMode:Averaged 11.055-11.065(1612-1614) BasePeak:93.05(14942)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:6832 Library:NIST14s.lib

SI:95 Formula:C₁₀H₁₆ CAS:508-32-7 MolWeight:136 RefIndex:729

CompName:Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1,7,7-trimethyl- \$\$ Tricyclene \$\$ 1,7,7-Trimethyltricyclo[2.2.1.0,2,6]heptane

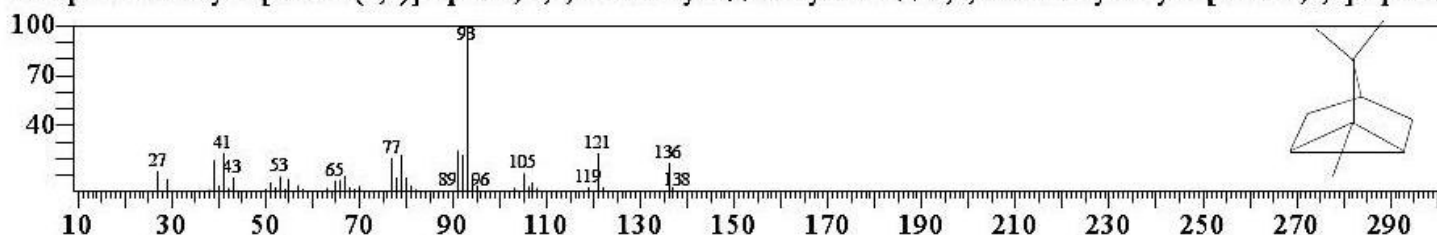


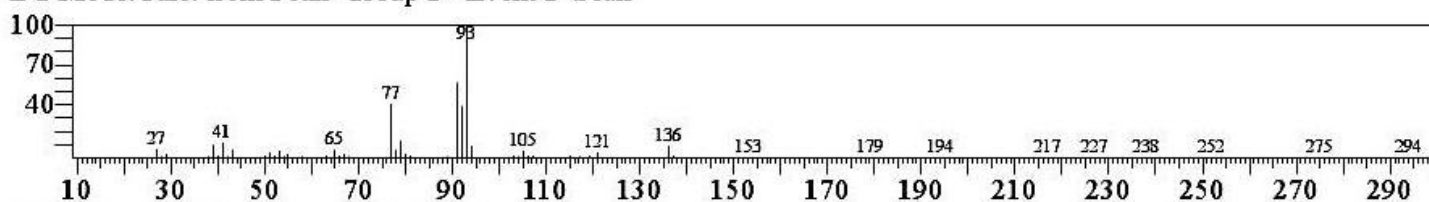
Figura 20. Espectro de la estructura del 1,7,7-trimetil triciclo [2.2.1.0(2,6) heptano

<< Target >>

Line#:9 R.Time:11.575(Scan#:1716) MassPeaks:167

RawMode:Averaged 11.570-11.580(1715-1717) BasePeak:93.05(505964)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:6837 Library:NIST14s.lib

SI:96 Formula:C₁₀H₁₆ CAS:2867-05-2 MolWeight:136 RefIndex:902

CompName:Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)- \$\$ 3-Thujene \$\$.alpha.-Thujene \$\$ Thujene, .alpha.

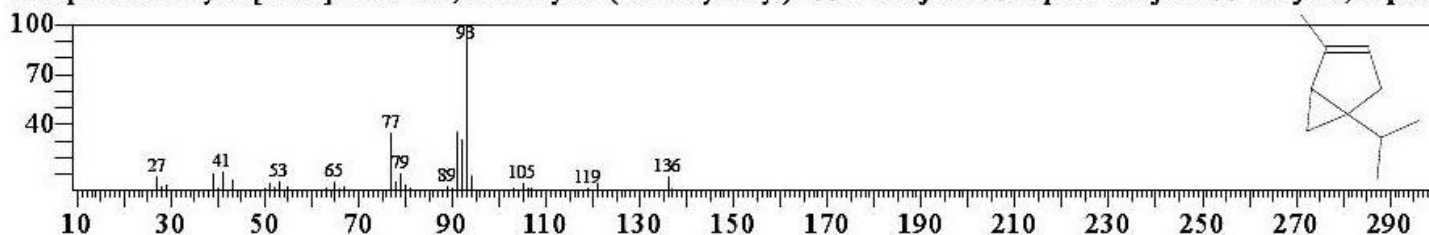


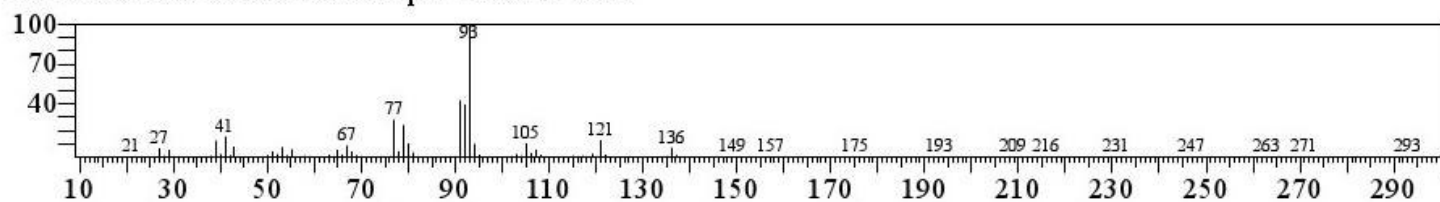
Figura 21. Espectro de la estructura del 2-metil-5-(1-metiletil) biciclo [3.1.0] 2-hexeno

<< Target >>

Line#:10 R.Time:12.090(Scan#:1819) MassPeaks:173

RawMode:Averaged 12.085-12.095(1818-1820) BasePeak:93.05(780712)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:6850 Library:NIST14s.lib

SI:96 Formula:C10H16 CAS:80-56-8 MolWeight:136 RetIndex:948

CompName:.alpha.-Pinene \$\$ Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6,6-trimethyl- \$\$ 2-Pinene \$\$ 2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]h

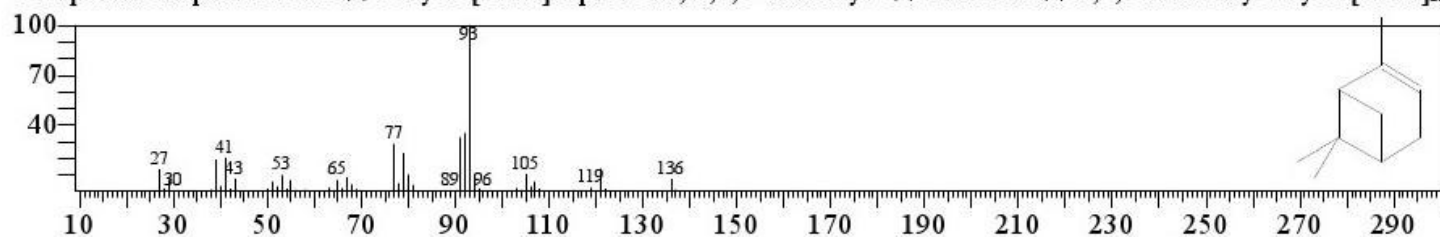


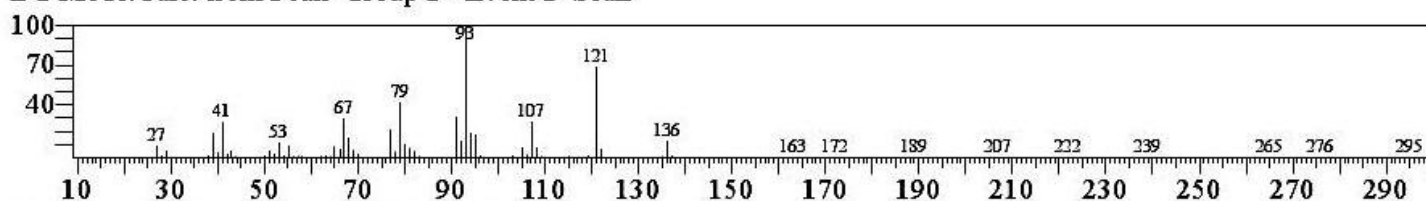
Figura 22. Espectro de la estructura del alfa-pineno

<< Target >>

Line#:11 R.Time:13.390(Scan#:2079) MassPeaks:172

RawMode:Averaged 13.385-13.395(2078-2080) BasePeak:93.05(195257)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:6853 Library:NIST14s.lib

SI:97 Formula:C10H16 CAS:79-92-5 MolWeight:136 RetIndex:943

CompName:Camphene \$\$ Bicyclo[2.2.1]heptane, 2,2-dimethyl-3-methylene- \$\$ 2,2-Dimethyl-3-methylenebicyclo[2.2.1]

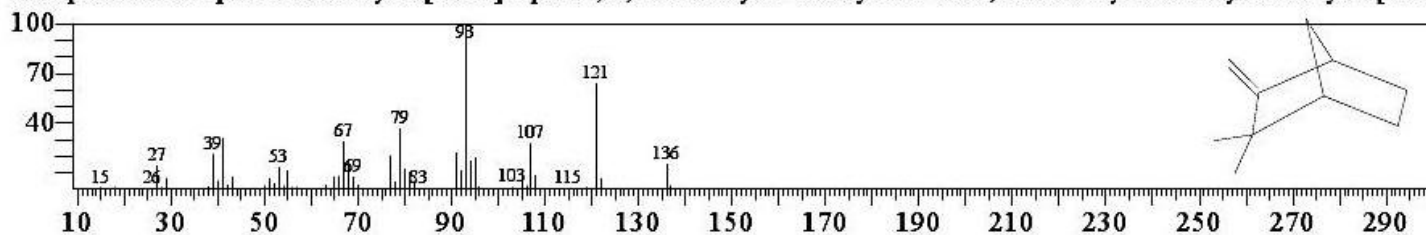


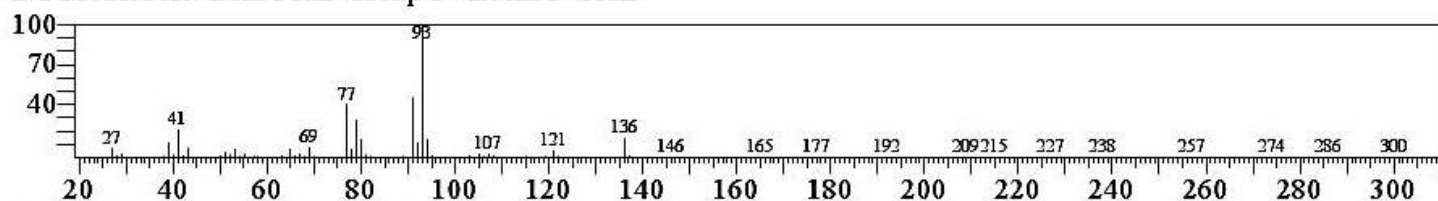
Figura 23. Espectro de la estructura del canfeno

<< Target >>

Line#:12 R.Time:16.305(Scan#:2662) MassPeaks:184

RawMode:Averaged 16.300-16.310(2661-2663) BasePeak:93.05(686928)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:6822 Library:NIST14s.lib

SI:94 Formula:C₁₀H₁₆ CAS:555-10-2 MolWeight:136 RetIndex:964

CompName:.beta.-Phellandrene \$\$ Cyclohexene, 3-methylene-6-(1-methylethyl)- \$\$ p-Mentha-1(7),2-diene \$\$ Phellandrene

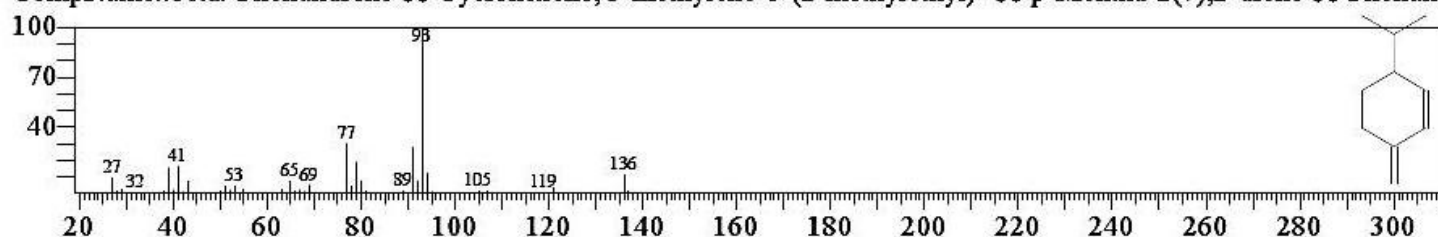


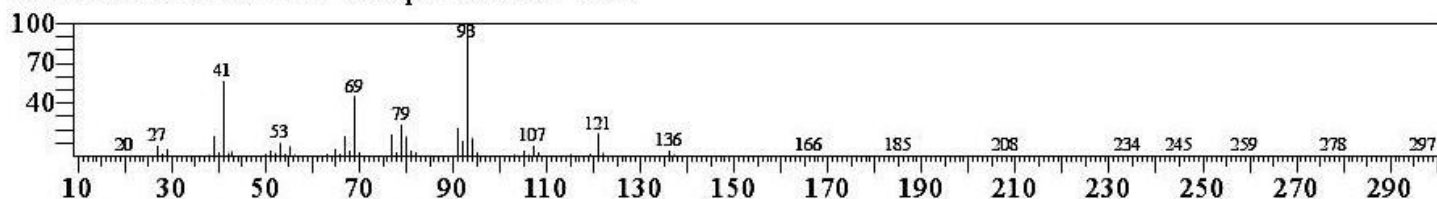
Figura 24. Espectro de la estructura del beta-felandreno

<< Target >>

Line#:13 R.Time:16.480(Scan#:2697) MassPeaks:198

RawMode:Averaged 16.475-16.485(2696-2698) BasePeak:93.05(110295)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:6809 Library:NIST14s.lib

SI:95 Formula:C₁₀H₁₆ CAS:127-91-3 MolWeight:136 RetIndex:943

CompName:.beta.-Pinene \$\$ Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene- \$\$ 2(10)-Pinene \$\$ Nopinene \$\$ Nopinene

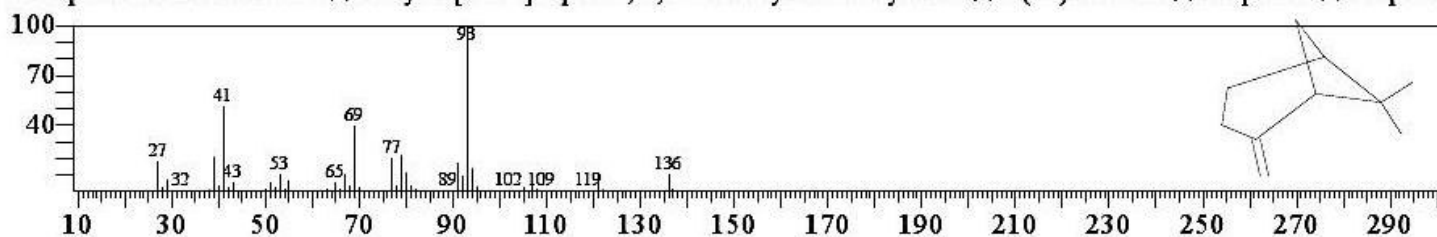


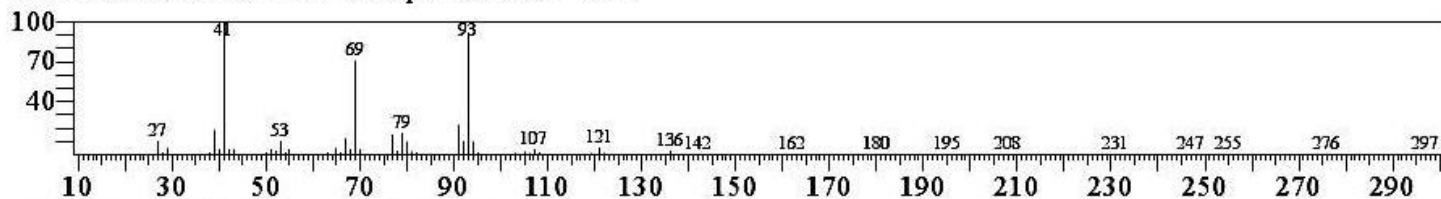
Figura 25. Espectro de la estructura del beta-pineno

<< Target >>

Line#:14 R.Time:19.110(Scan#:3223) MassPeaks:189

RawMode:Averaged 19.105-19.115(3222-3224) BasePeak:40.95(571280)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:6778 Library:NIST14s.lib

SI:95 Formula:C10H16 CAS:123-35-3 MolWeight:136 RetIndex:958

CompName:.beta.-Myrcene \$\$ 1,6-Octadiene, 7-methyl-3-methylene- \$\$ Myrcene \$\$ 7-Methyl-3-methylene-1,6-octadi

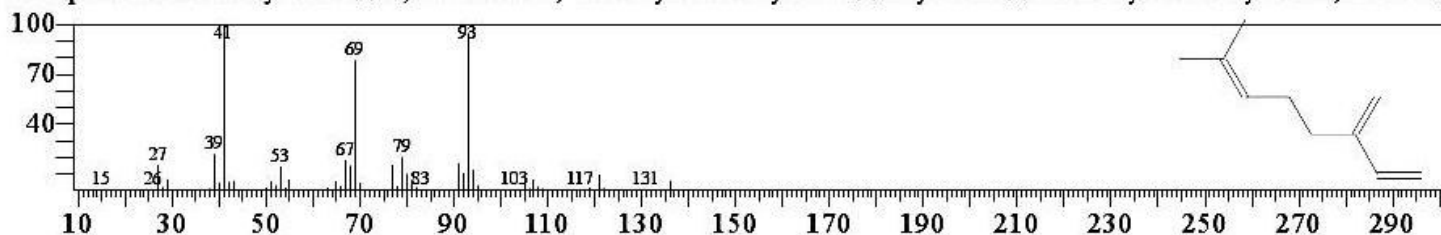


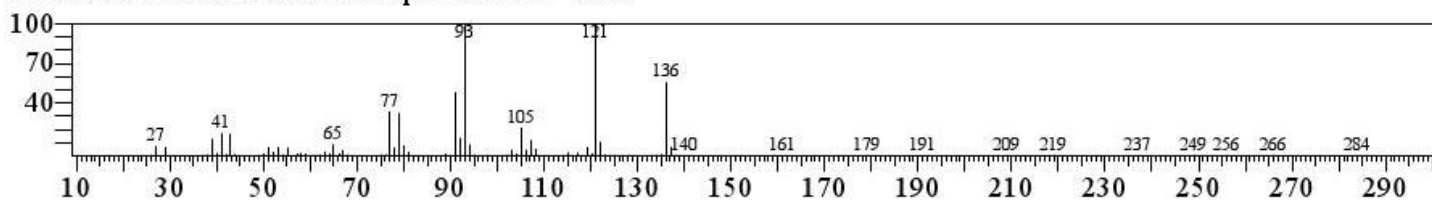
Figura 26. Espectro de la estructura del beta-mirceno

<< Target >>

Line#:15 R.Time:22.635(Scan#:3928) MassPeaks:169

RawMode:Averaged 22.630-22.640(3927-3929) BasePeak:121.10(36225)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:6867 Library:NIST14s.lib

SI:94 Formula:C10H16 CAS:586-62-9 MolWeight:136 RetIndex:1052

CompName:Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)- \$\$ p-Mentha-1,4(8)-diene \$\$ Terpinolene \$\$ Terpinolen \$\$

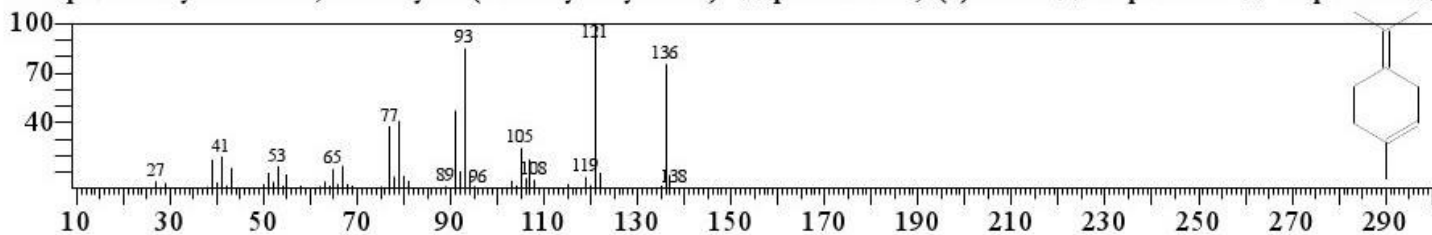


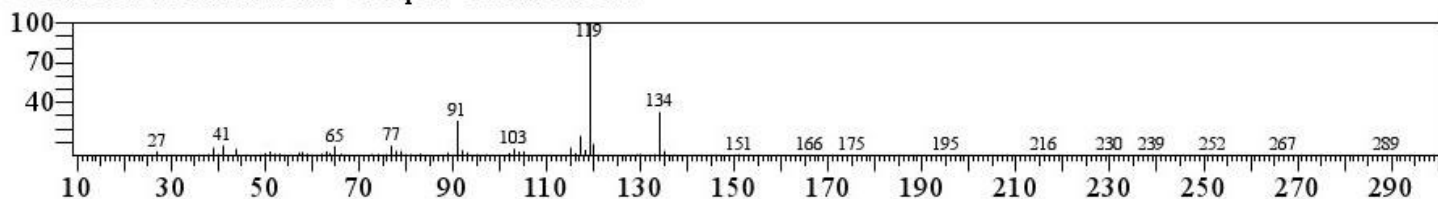
Figura 27. Espectro de la estructura del 1-metil-4-(1-metiletilideno) ciclohexeno (terpinoleno)

<< Target >>

Line#:16 R. Time:24.180(Scan#:4237) MassPeaks:170

RawMode:Averaged 24.175-24.185(4236-4238) BasePeak:119.10(13330)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:6391 Library:NIST14s.lib

SI:94 Formula:C10H14 CAS:527-84-4 MolWeight:134 RetIndex:1042

CompName:o-Cymene \$\$ Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)- \$\$ o-Cymol \$\$ o-Isopropyltoluene \$\$ 1-Isopropyl-2-m

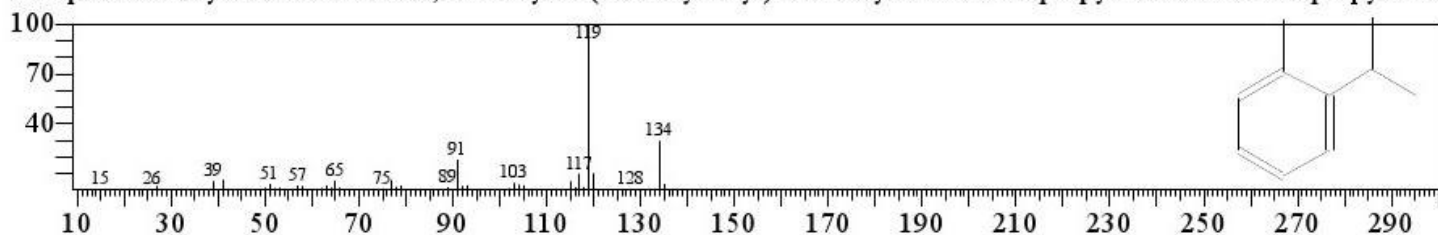


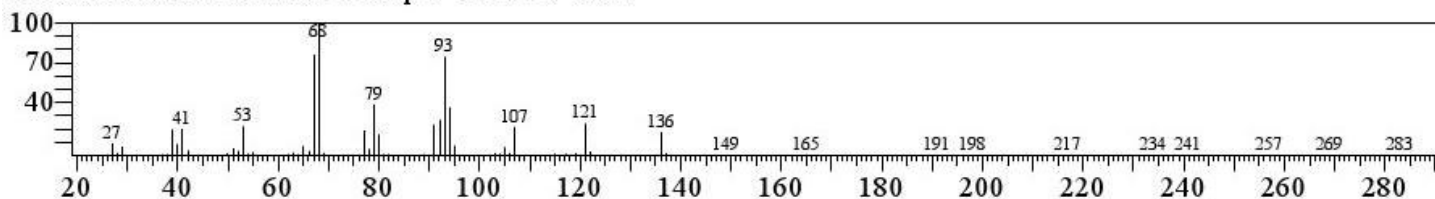
Figura 28. Espectro de la estructura del O-cimeno

<< Target >>

Line#:17 R. Time:24.860(Scan#:4373) MassPeaks:142

RawMode:Averaged 24.855-24.865(4372-4374) BasePeak:68.00(54584)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:6793 Library:NIST14s.lib

SI:92 Formula:C10H16 CAS:5989-27-5 MolWeight:136 RetIndex:1018

CompName:D-Limonene \$\$ Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-, (R)- \$\$ p-Mentha-1,8-diene, (R)-(+)- \$\$ (+)-

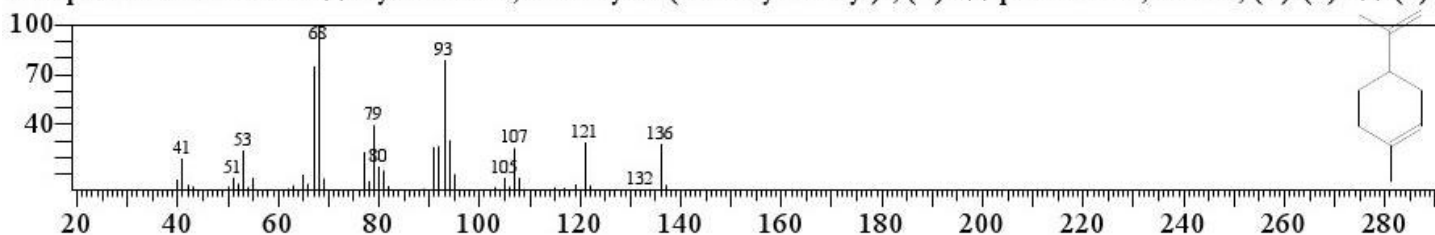


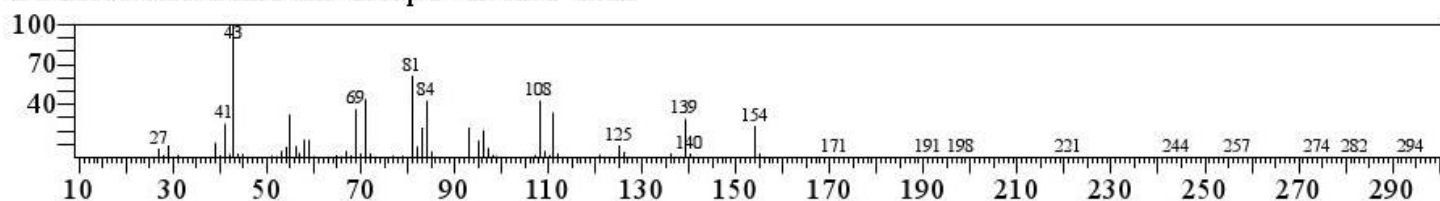
Figura 29. Espectro de la estructura del D-limoneno

<< Target >>

Line#:18 R.Time:25.105(Scan#:4422) MassPeaks:179

RawMode:Averaged 25.100-25.110(4421-4423) BasePeak:42.95(186609)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:10306 Library:NIST14s.lib

SI:92 Formula:C10H18O CAS:470-82-6 MolWeight:154 RetIndex:1059

CompName:Eucalyptol \$\$ Cineole \$\$ 2-Oxabicyclo[2.2.2]octane, 1,3,3-trimethyl- \$\$ p-Menthane, 1,8-epoxy- \$\$ p-Cin

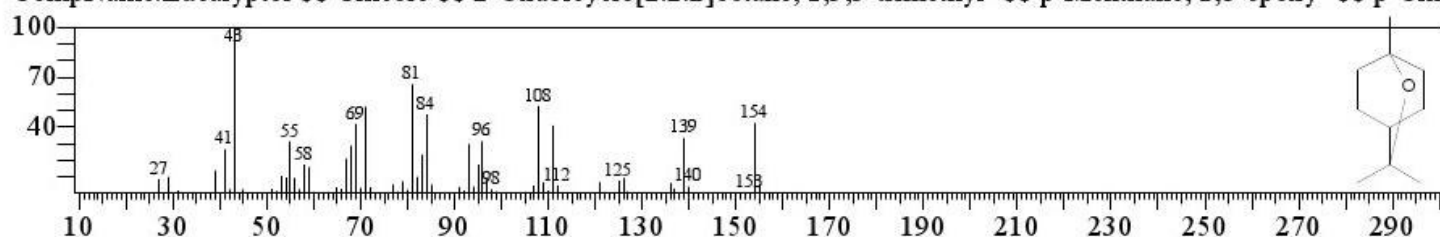


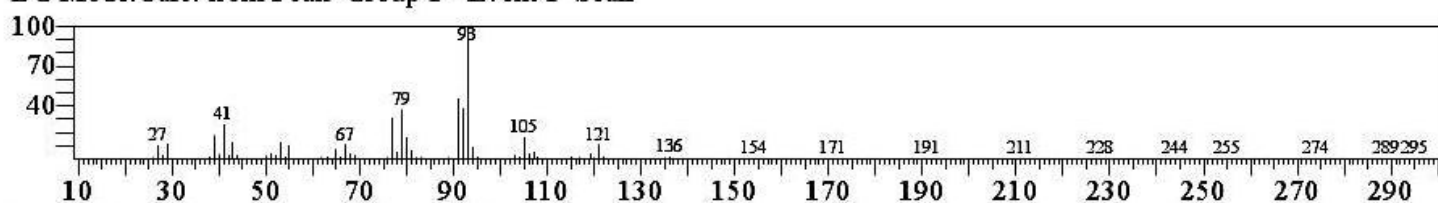
Figura 30. Espectro de la estructura del eucaliptol

<< Target >>

Line#:19 R.Time:27.880(Scan#:4977) MassPeaks:158

RawMode:Averaged 27.875-27.885(4976-4978) BasePeak:93.05(17497)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:6844 Library:NIST14s.lib

SI:97 Formula:C10H16 CAS:3779-61-1 MolWeight:136 RetIndex:976

CompName:trans-.beta.-Ocimene \$\$ 1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)- \$\$.beta.-trans-Ocimene \$\$ trans-3,7-Dimethy

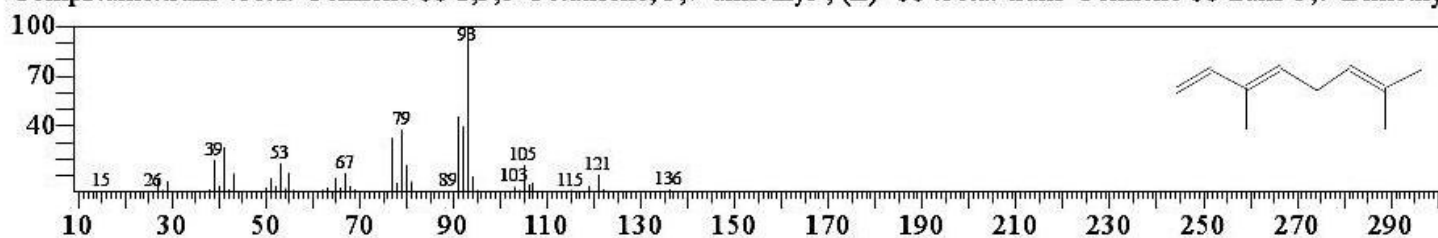


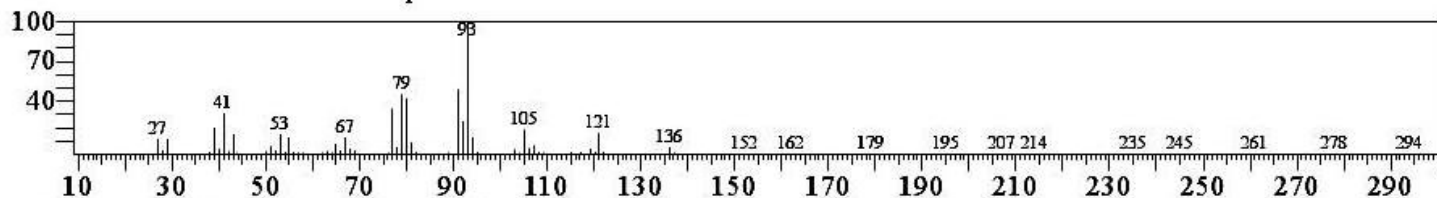
Figura 31. Espectro de la estructura del trans-beta-ocimeno

<< Target >>

Line#:20 R.Time:30.125(Scan#:5426) MassPeaks:201

RawMode:Averaged 30.120-30.130(5425-5427) BasePeak:93.05(124269)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:6842 Library:NIST14s.lib

SI:98 Formula:C10H16 CAS:3338-55-4 MolWeight:136 RefIndex:976

CompName:1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (Z)- \$\$.beta.-cis-Ocimene \$\$ cis-.beta.-Ocimene \$\$ cis-3,7-Dimethyl-1,3,6-

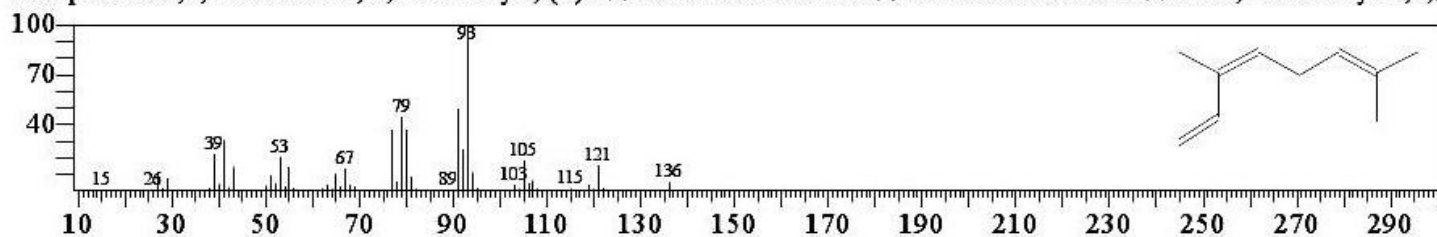


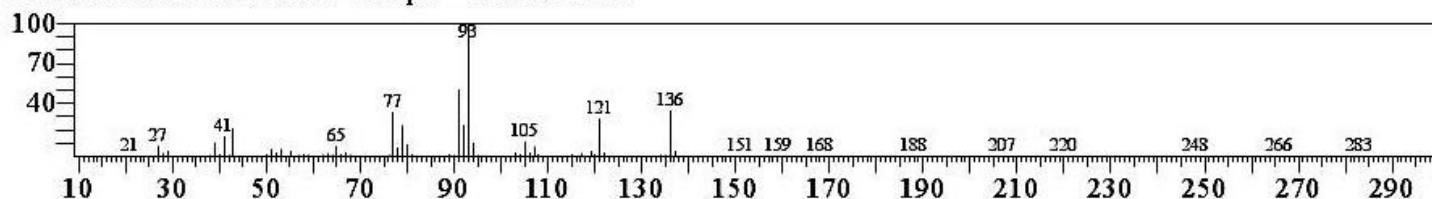
Figura 32. Espectro de la estructura del 3,7-dimetil- 1,3,6-octatrieno (Z-ocimeno)

<< Target >>

Line#:21 R.Time:31.580(Scan#:5717) MassPeaks:213

RawMode:Averaged 31.575-31.585(5716-5718) BasePeak:93.05(47352)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:6846 Library:NIST14s.lib

SI:96 Formula:C10H16 CAS:99-85-4 MolWeight:136 RefIndex:998

CompName:.gamma.-Terpinene \$\$ 1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)- \$\$.gamma.-Terpinen \$\$ p-Mentha-

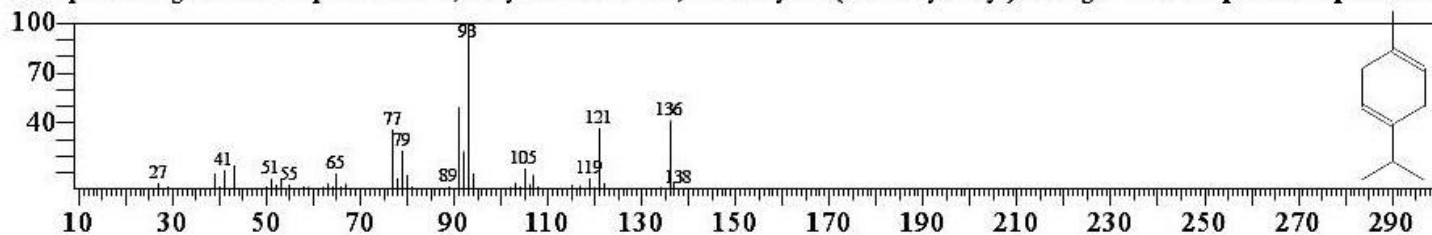


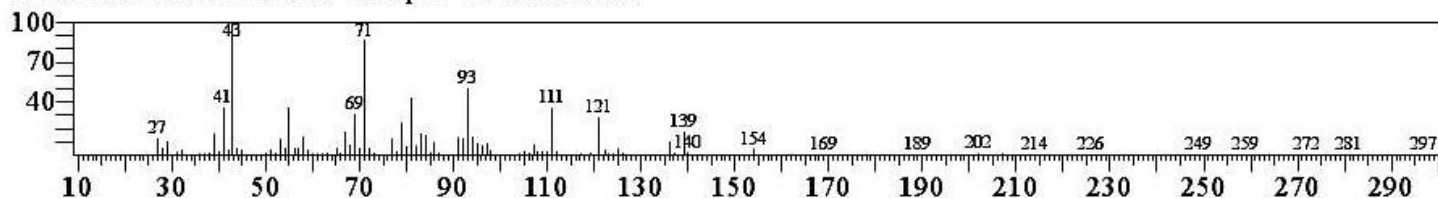
Figura 33. Espectro de la estructura del gamma-terpineno

<< Target >>

Line#:22 R.Time:32.950(Scan#:5991) MassPeaks:185

RawMode:Averaged 32.945-32.955(5990-5992) BasePeak:42.95(13792)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:10354 Library:NIST14s.lib

SI:91 Formula:C10H18O CAS:17699-16-0 MolWeight:154 RetIndex:1041

CompName:Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,2.alpha.,5.alpha.)- \$\$ (1R,2R,5S)-5-Isopropyl-

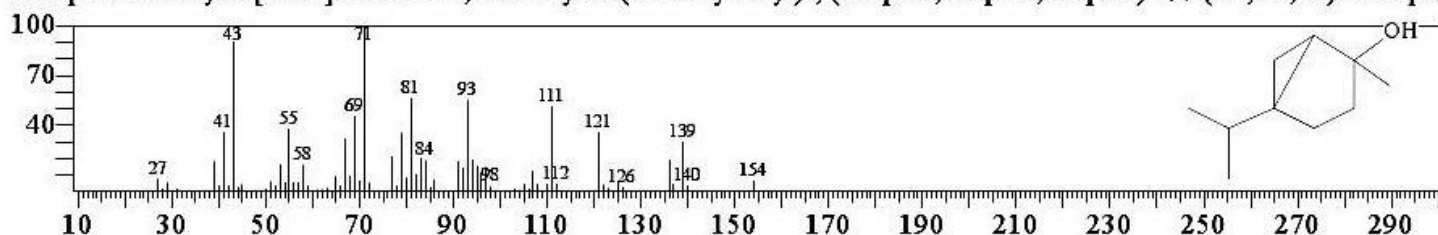


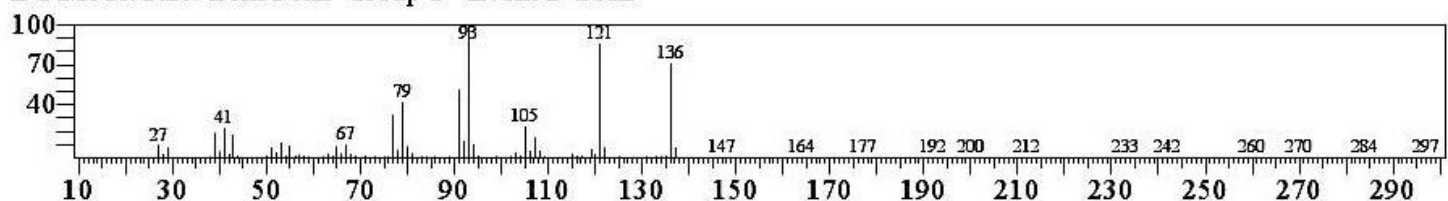
Figura 34. Espectro de la estructura del 2-metil-5-(1-metiletil)-, (1.alfa.,2.alfa.,5.alfa) biciclo [3.1.0] 2-hexanol

<< Target >>

Line#:23 R.Time:35.820(Scan#:6565) MassPeaks:179

RawMode:Averaged 35.815-35.825(6564-6566) BasePeak:93.05(12642)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:3 Entry:6859 Library:NIST14s.lib

SI:93 Formula:C10H16 CAS:554-61-0 MolWeight:136 RetIndex:948

CompName:2-Carene \$\$ Bicyclo[4.1.0]hept-2-ene, 3,7,7-trimethyl- \$\$.delta.-2-Carene \$\$ (+/-)-2-Carene \$\$ 3,7,7-Tri-

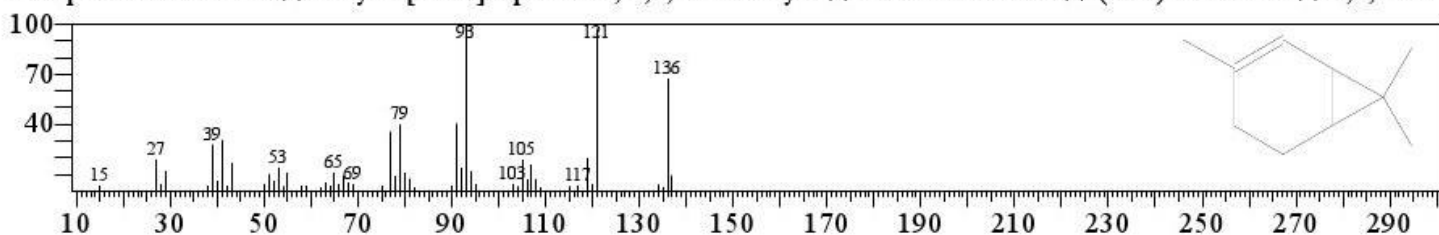


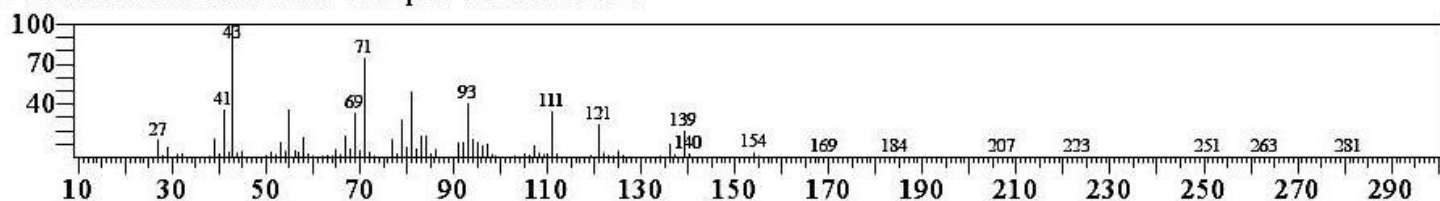
Figura 35. Espectro de la estructura del 2-careno

<< Target >>

Line#:24 R.Time:36.935(Scan#:6788) MassPeaks:189

RawMode:Averaged 36.930-36.940(6787-6789) BasePeak:42.95(17004)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:2 Entry:10362 Library:NIST14s.lib

SI:90 Formula:C10H18O CAS:15537-55-0 MolWeight:154 RetIndex:1041

CompName:Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)- \$\$ 5-Isopropyl-2-methyl

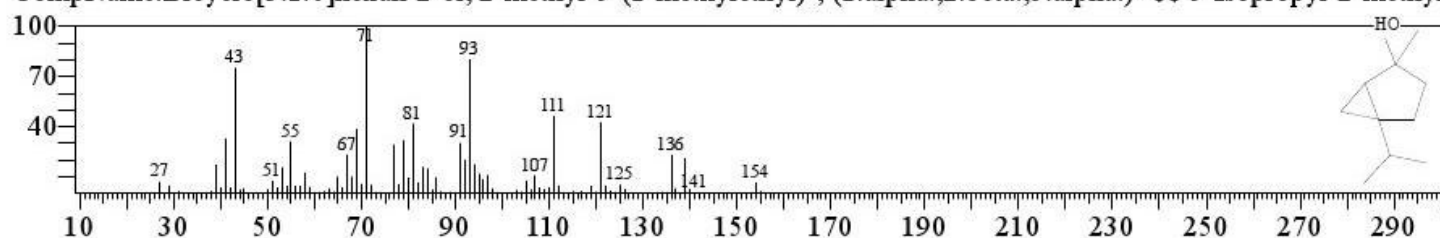


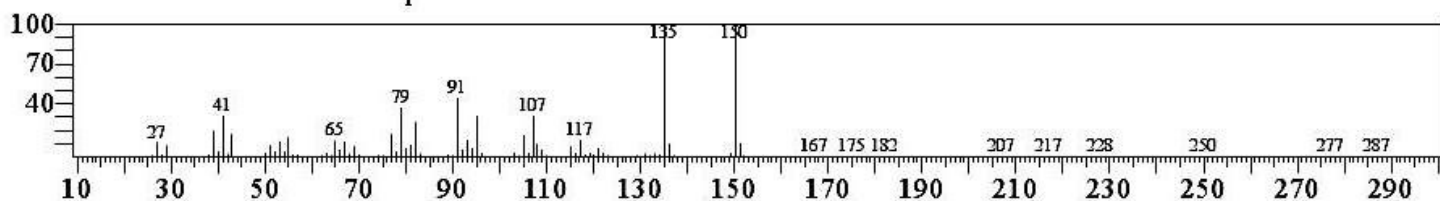
Figura 36. Espectro de la estructura del 2-metil-5-(1-metiletil)-, (1.alfa.,2.beta.,5.alfa) biciclo [3.1.0] 2-hexanol

<< Target >>

Line#:25 R.Time:37.540(Scan#:6909) MassPeaks:203

RawMode:Averaged 37.535-37.545(6908-6910) BasePeak:135.10(2446911)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:9373 Library:NIST14s.lib

SI:86 Formula:C11H18 CAS:5293-90-3 MolWeight:150 RetIndex:1105

CompName:Cyclohexene, 2-ethenyl-1,3,3-trimethyl- \$\$ 1,3,3-Trimethyl-2-vinyl-1-cyclohexene # \$\$

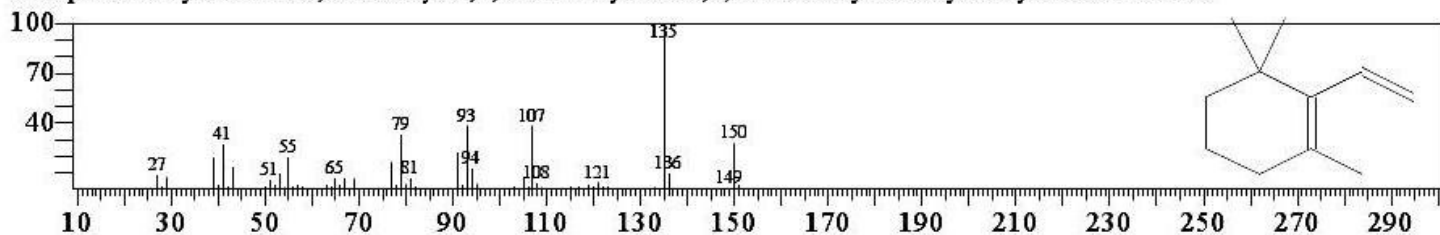


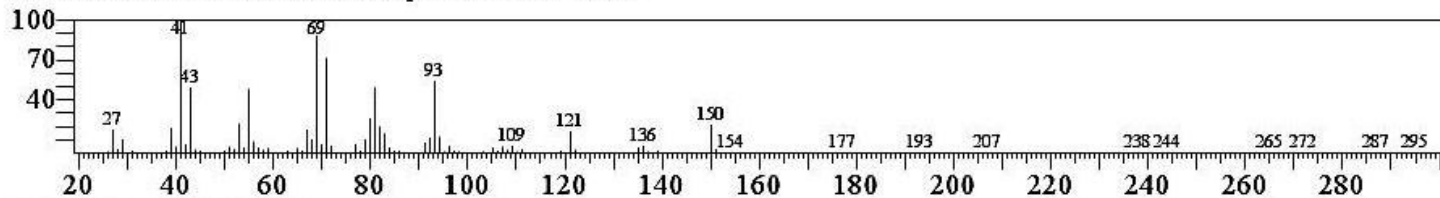
Figura 37. Espectro de la estructura del 1,3,3-trimetil-2-etenil ciclohexeno

<< Target >>

Line#:26 R.Time:37.665(Scan#:6934) MassPeaks:211

RawMode:Averaged 37.660-37.670(6933-6935) BasePeak:40.95(143767)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:10359 Library:NIST14s.lib

SI:89 Formula:C10H18O CAS:78-70-6 MolWeight:154 RefIndex:1082

CompName:Linalool \$\$ 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl- \$\$.beta.-Linalool \$\$ Linalol \$\$ Linalyl alcohol \$\$ 2,6-Dimet

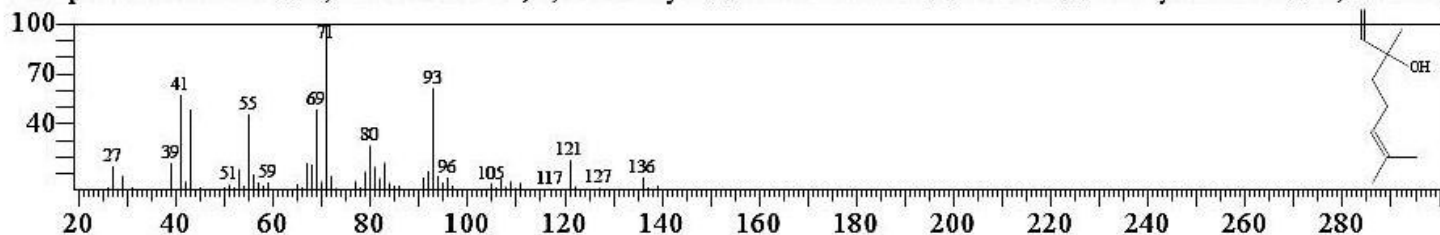


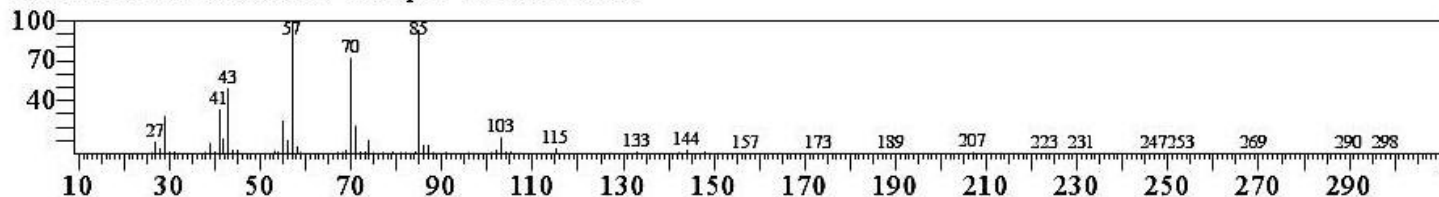
Figura 38. Espectro de la estructura del linalool

<< Target >>

Line#:27 R.Time:38.105(Scan#:7022) MassPeaks:194

RawMode:Averaged 38.100-38.110(7021-7023) BasePeak:57.05(29120)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:13640 Library:NIST14s.lib

SI:96 Formula:C10H20O2 CAS:2445-78-5 MolWeight:172 RefIndex:1054

CompName:Butanoic acid, 2-methyl-, 2-methylbutyl ester \$\$ Butyric acid, 2-methyl-, 2-methylbutyl ester \$\$ 2-Methylb

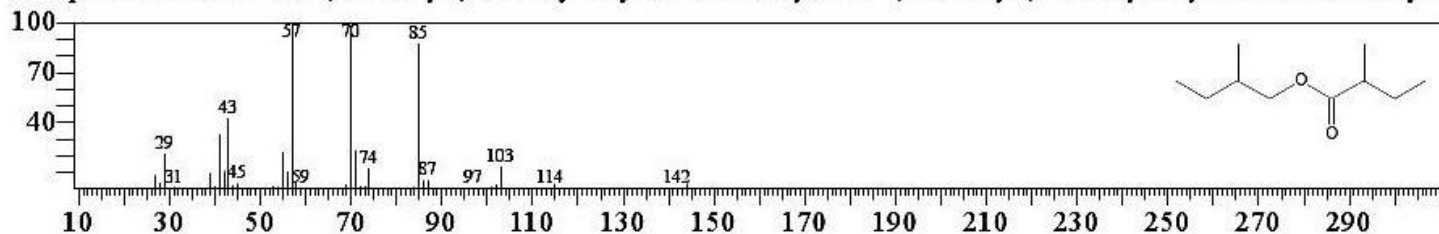


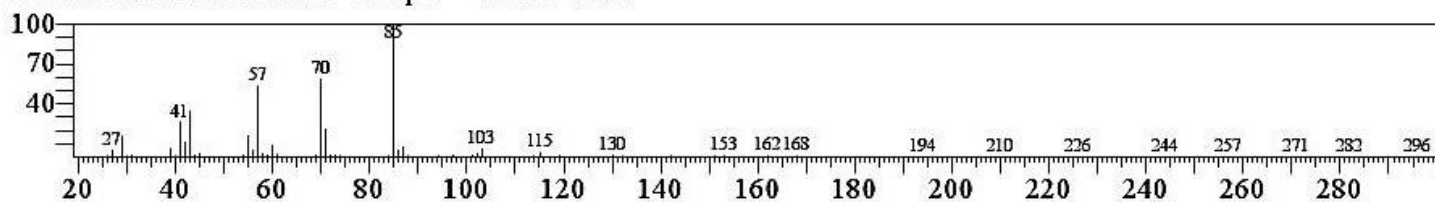
Figura 39. Espectro de la estructura del 2-metil butanoato de (2-metil) butilo

<< Target >>

Line#:28 R.Time:38.560(Scan#:7113) MassPeaks:156

RawMode:Averaged 38.555-38.565(7112-7114) BasePeak:85.05(10057)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:13680 Library:NIST14s.lib

SI:94 Formula:C10H20O2 CAS:2445-77-4 MolWeight:172 RetIndex:1054

CompName:Butanoic acid, 3-methyl-, 2-methylbutyl ester \$\$ Isovaleric acid, 2-methylbutyl ester \$\$ 2-Methylbutyl isov

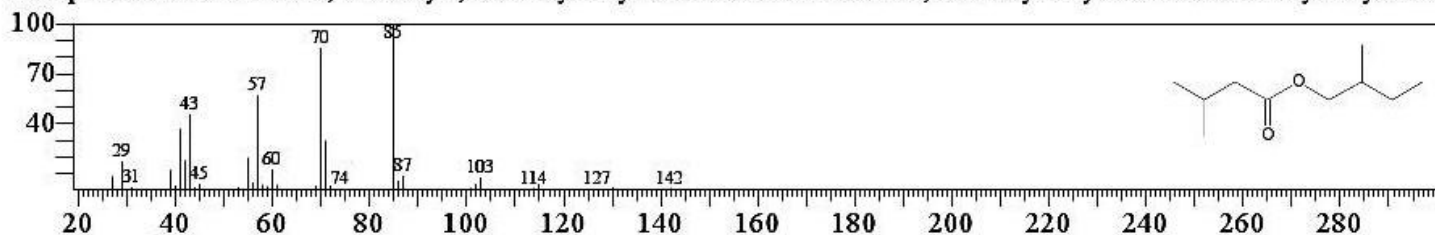


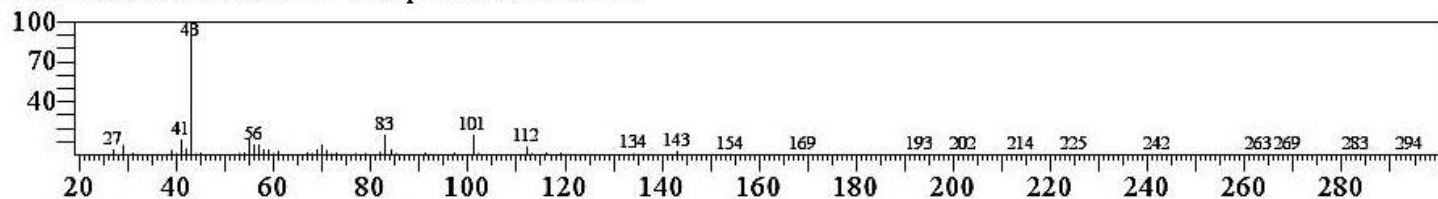
Figura 40. Espectro de la estructura del 3-metil butanoato de (2-metil) butilo

<< Target >>

Line#:29 R.Time:40.045(Scan#:7410) MassPeaks:180

RawMode:Averaged 40.040-40.050(7409-7411) BasePeak:42.95(29742)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:13633 Library:NIST14s.lib

SI:96 Formula:C10H20O2 CAS:4864-61-3 MolWeight:172 RetIndex:1118

CompName:3-Octanol, acetate \$\$ 3-Octyl acetate \$\$ Acetic acid, 1-ethylhexyl ester \$\$ 1-Ethylhexyl acetate # \$\$ 3-Octa

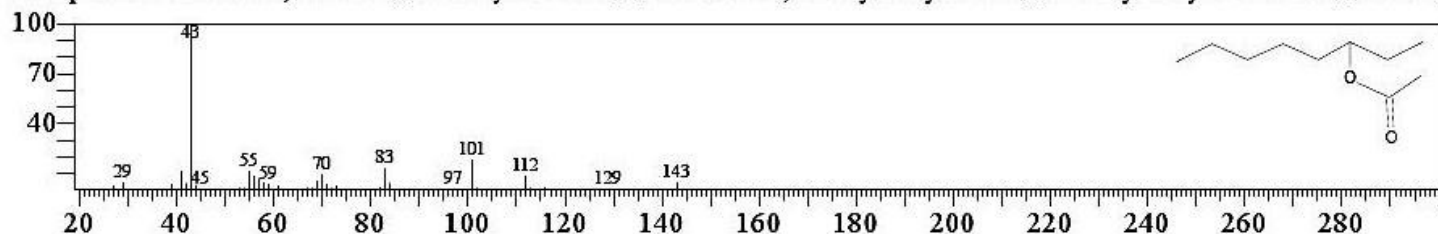


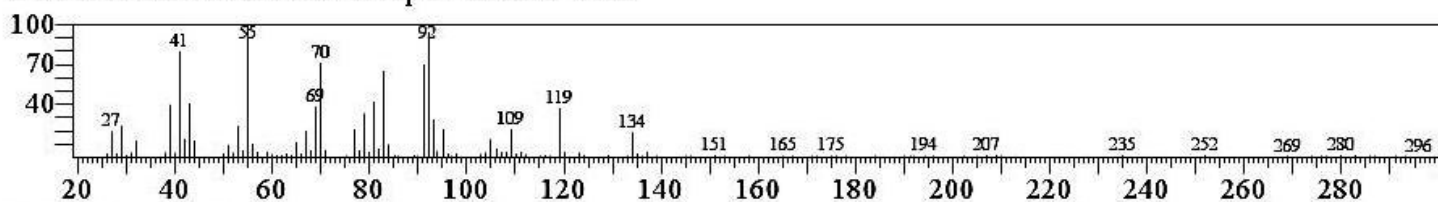
Figura 41. Espectro de la estructura del acetato de 3-octilo

<< Target >>

Line#:30 R.Time:40.355(Scan#:7472) MassPeaks:173

RawMode:Averaged 40.350-40.360(7471-7473) BasePeak:55.00(4083)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:9878 Library:NIST14s.lib

SI:92 Formula:C10H16O CAS:547-61-5 MolWeight:152 RetIndex:1131

CompName:Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol, 6,6-dimethyl-2-methylene-, [1S-(1.alpha.,3.alpha.,5.alpha.)]- \$\$ (1S,3R,5S)-6,6-

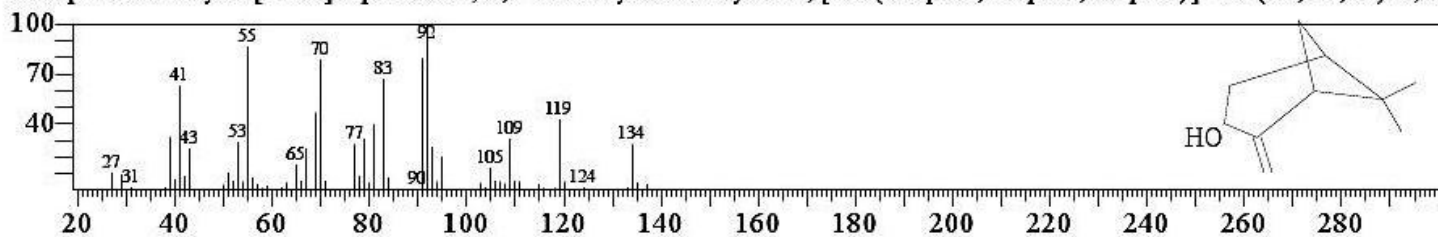


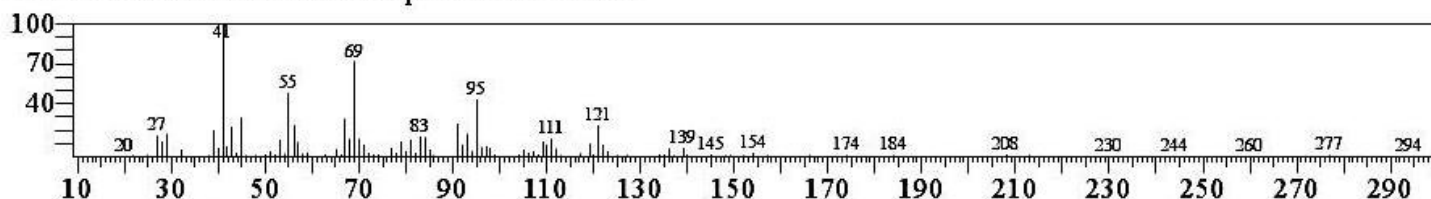
Figura 42. Espectro de la estructura del 6,6-dimetil- 2-metileno-[1S-(1.alfa.,3.alfa.,5.alfa)] biciclo [3.1.1] 3-heptanol

<< Target >>

Line#:31 R.Time:41.980(Scan#:7797) MassPeaks:180

RawMode:Averaged 41.975-41.985(7796-7798) BasePeak:40.95(7356)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:10285 Library:NIST14s.lib

SI:88 Formula:C10H18O CAS:106-23-0 MolWeight:154 RetIndex:1125

CompName:Citronellal \$\$ 6-Octenal, 3,7-dimethyl- \$\$.beta.-Citronellal \$\$ Rhodinal \$\$ 3,7-Dimethyl-6-octenal \$\$ Citr

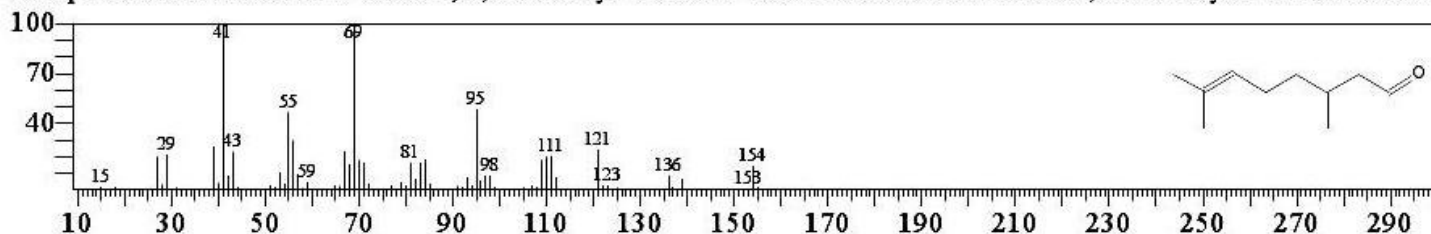


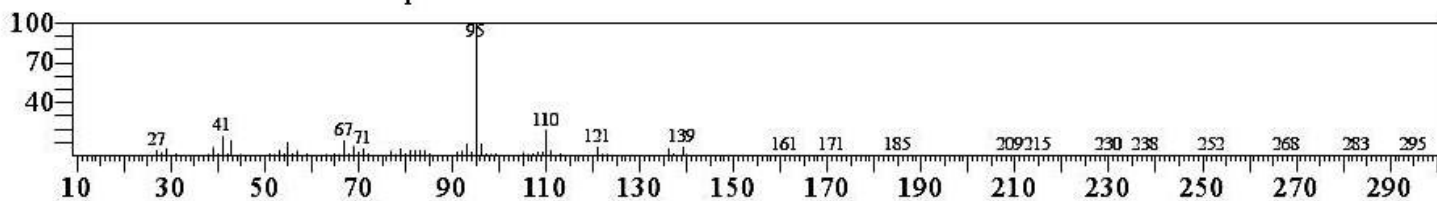
Figura 43. Espectro de la estructura del citronelal

<< Target >>

Line#:32 R.Time:42.490(Scan#:7899) MassPeaks:176

RawMode:Averaged 42.485-42.495(7898-7900) BasePeak:95.10(22631)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:10402 Library:NIST14s.lib

SI:96 Formula:C₁₀H₁₈O CAS:507-70-0 MolWeight:154 RetIndex:1138

CompName:endo-Borneol \$\$ endo-2-Hydroxy-1,7,7-trimethylnorbornane \$\$ Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl-

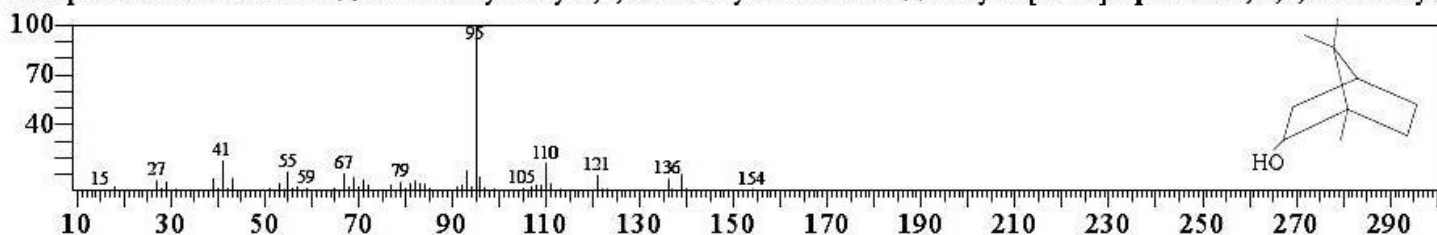


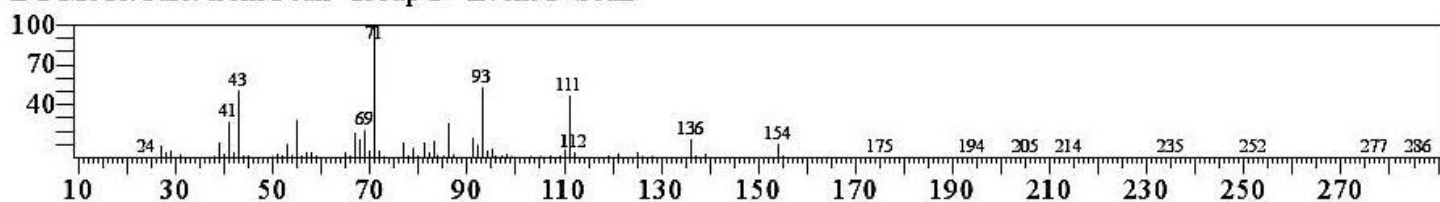
Figura 44. Espectro de la estructura del endo-borneol

<< Target >>

Line#:33 R.Time:43.285(Scan#:8058) MassPeaks:158

RawMode:Averaged 43.280-43.290(8057-8059) BasePeak:71.00(24495)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:10355 Library:NIST14s.lib

SI:95 Formula:C₁₀H₁₈O CAS:562-74-3 MolWeight:154 RetIndex:1137

CompName:Terpinen-4-ol \$\$ 3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)- \$\$ p-Menth-1-en-4-ol \$\$ 1-Terpinen-4-ol

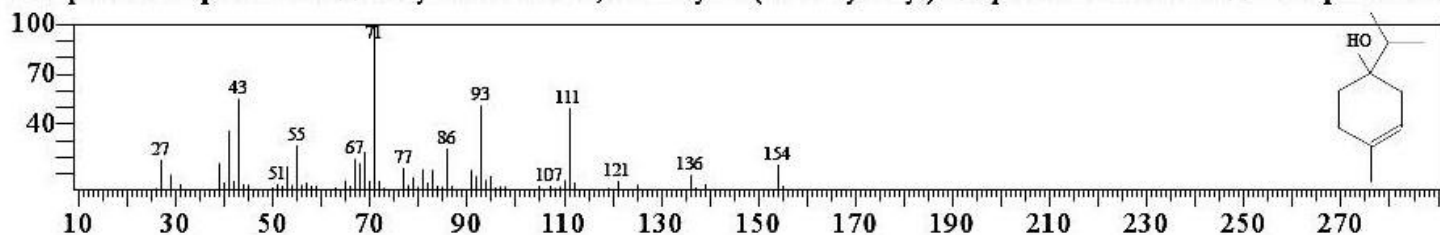


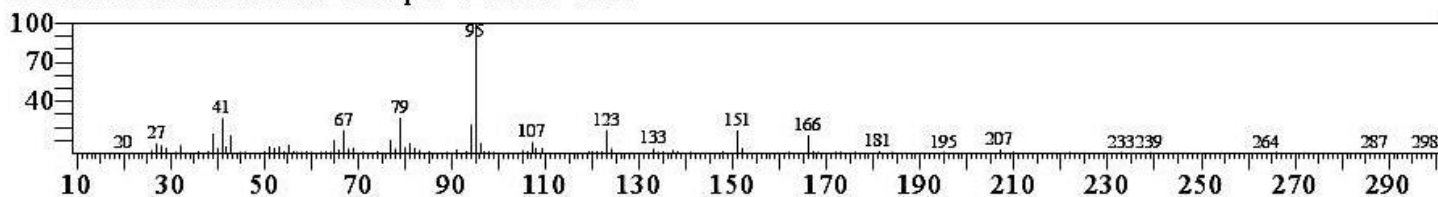
Figura 45. Espectro de la estructura del terpinen-4-ol

<< Target >>

Line#:34 R. Time:43.495(Scan#:8100) MassPeaks:184

RawMode:Averaged 43.490-43.500(8099-8101) BasePeak:95.05(7740)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:7245 Library:NIST14s.lib

SI:78 Formula:C10H18 CAS:500-00-5 MolWeight:138 RetIndex:987

CompName:Cyclohexene, 4-methyl-1-(1-methylethyl)- \$\$ p-Menth-3-ene \$\$.delta.3-p-Menthene \$\$ Menthomenthene !

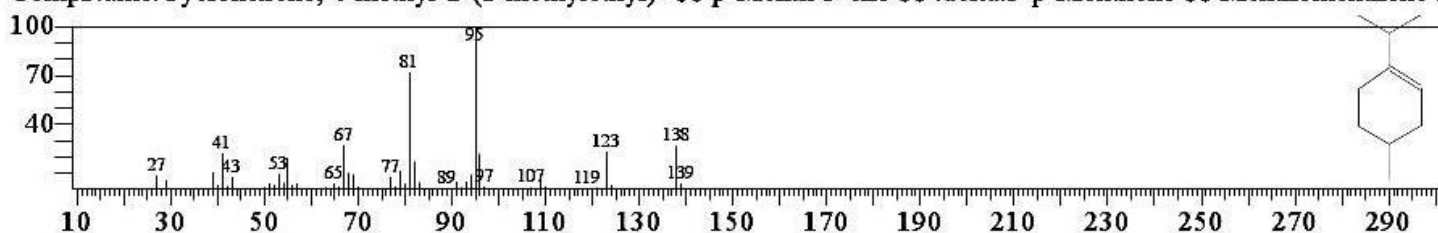


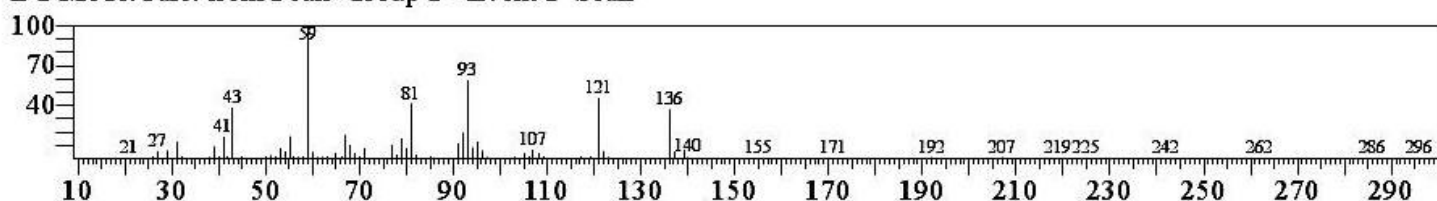
Figura 46. Espectro de la estructura del 4-metil-1-(1-metiletil) ciclohexeno (p-menteno)

<< Target >>

Line#:35 R. Time:44.240(Scan#:8249) MassPeaks:176

RawMode:Averaged 44.235-44.245(8248-8250) BasePeak:59.05(14831)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:10327 Library:NIST14s.lib

SI:96 Formula:C10H18O CAS:98-55-5 MolWeight:154 RetIndex:1143

CompName:.alpha.-Terpineol \$\$ 3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.,.alpha.4-trimethyl- \$\$ p-Menth-1-en-8-ol \$\$ Terpir

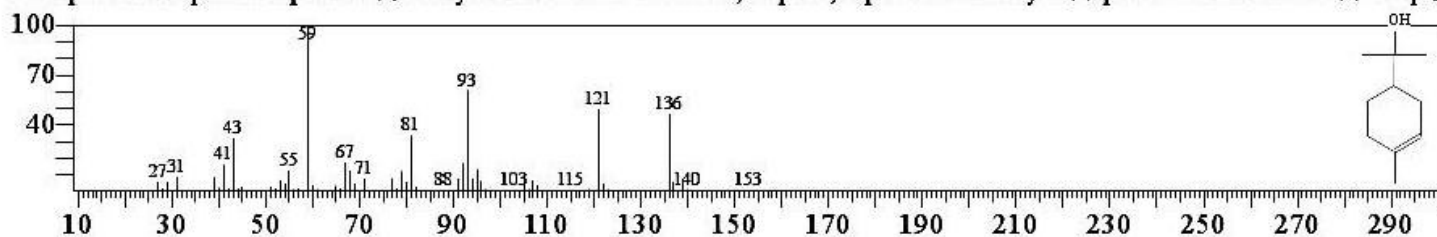


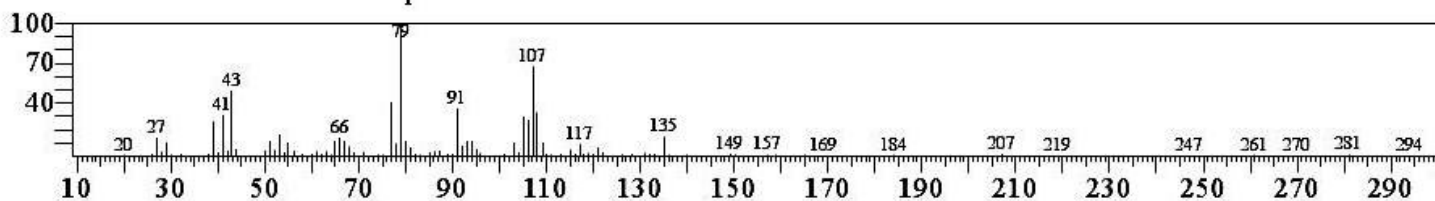
Figura 47. Espectro de la estructura del alfa-terpineol

<< Target >>

Line#:36 R.Time:44.440(Scan#:8289) MassPeaks:176

RawMode:Averaged 44.435-44.445(8288-8290) BasePeak:79.00(7454)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:9280 Library:NIST14s.lib

SI:93 Formula:C10H14O CAS:564-94-3 MolWeight:150 RetIndex:1136

CompName:Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene-2-carboxaldehyde, 6,6-dimethyl- \$\$ 2-Norpinene-2-carboxaldehyde, 6,6-dimethyl

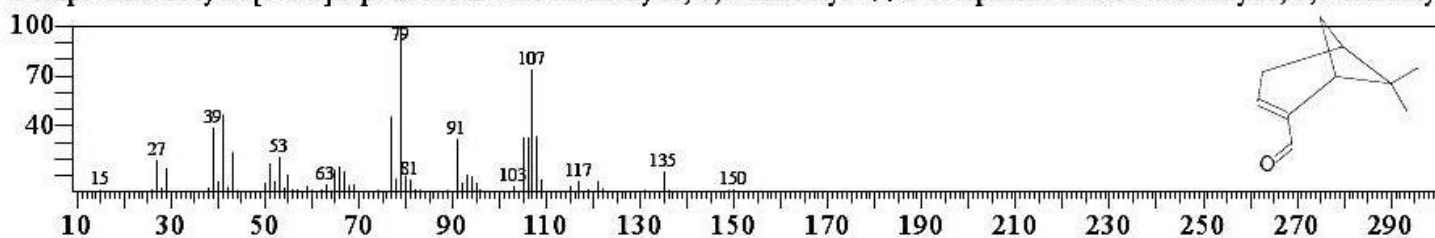


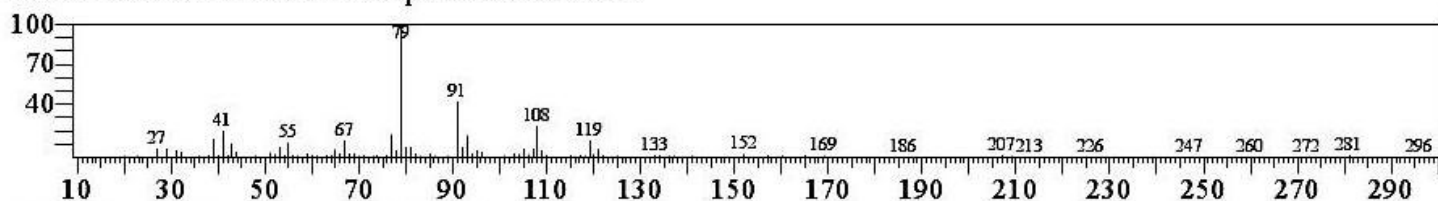
Figura 48. Espectro de la estructura del 6,6-dimetil biciclo [3.1.1] 2-hepten-2-carboxaldehído

<< Target >>

Line#:37 R.Time:44.590(Scan#:8319) MassPeaks:175

RawMode:Averaged 44.585-44.595(8318-8320) BasePeak:79.05(7241)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:9835 Library:NIST14s.lib

SI:91 Formula:C10H16O CAS:515-00-4 MolWeight:152 RetIndex:1191

CompName:Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene-2-methanol, 6,6-dimethyl- \$\$ 2-Pinen-10-ol \$\$ Myrtenol \$\$ (6,6-Dimethylbicyclo

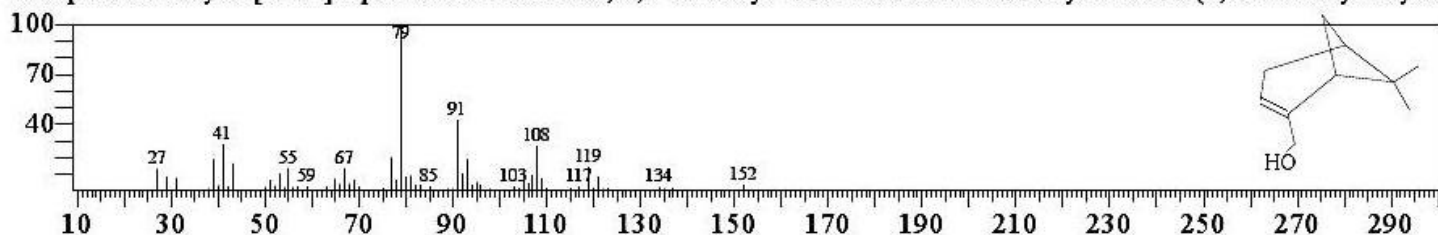


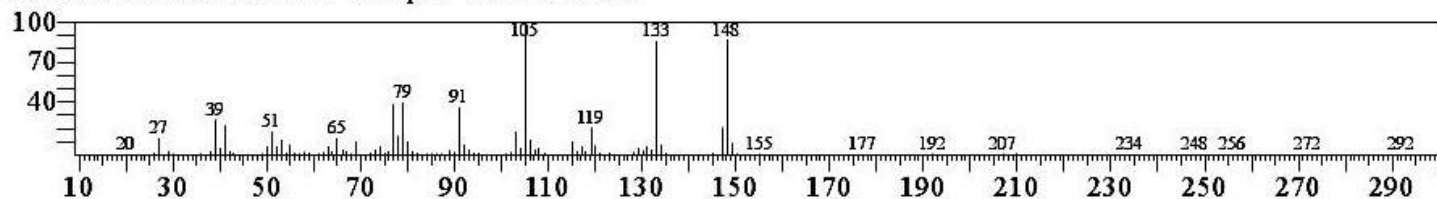
Figura 49. Espectro de la estructura del 6,6-dimetil biciclo [3.1.1]2-hepten-2-ol

<< Target >>

Line#:38 R.Time:44.870(Scan#:8375) MassPeaks:189

RawMode:Averaged 44.865-44.875(8374-8376) BasePeak:105.05(11120)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:8841 Library:NIST14s.lib

SI:88 Formula:C10H12O CAS:122-03-2 MolWeight:148 RetIndex:1230

CompName:Benzaldehyde, 4-(1-methylethyl)- \$\$ Benzaldehyde, p-isopropyl- \$\$ p-Cumic aldehyde \$\$ p-Isopropylbenz

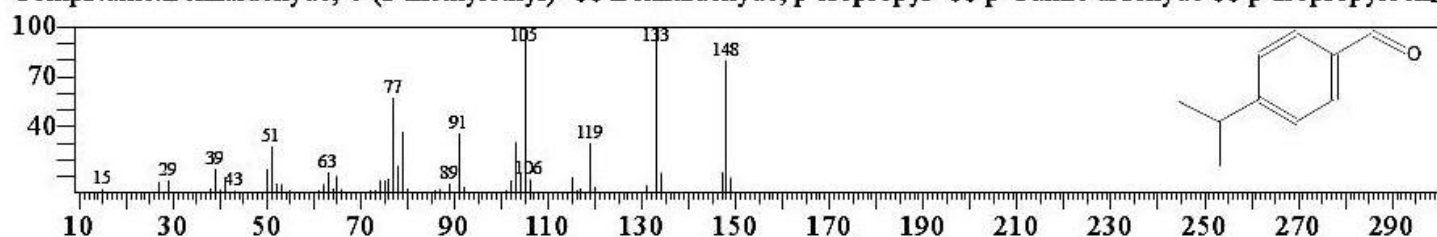


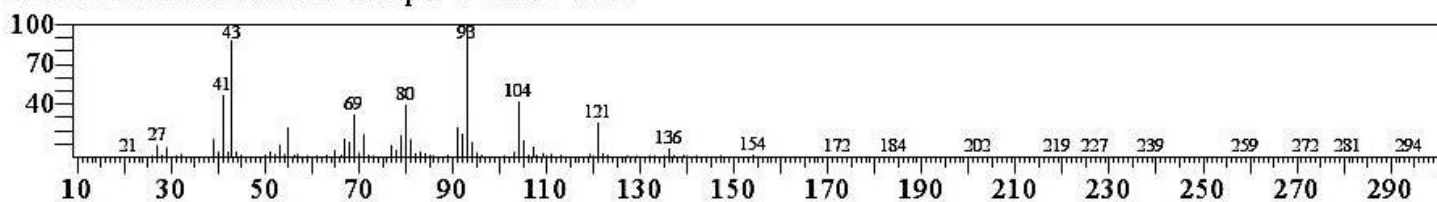
Figura 50. Espectro de la estructura del 4-(1-metiletil) benzaldehído (cuminaldehído)

<< Target >>

Line#:39 R.Time:48.020(Scan#:9005) MassPeaks:190

RawMode:Averaged 48.015-48.025(9004-9006) BasePeak:93.05(11861)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:17803 Library:NIST14s.lib

SI:90 Formula:C12H20O2 CAS:115-95-7 MolWeight:196 RetIndex:1272

CompName:Linalyl acetate \$\$ 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, acetate \$\$ Acetic acid linalool ester \$\$ Bergamiol \$\$ B

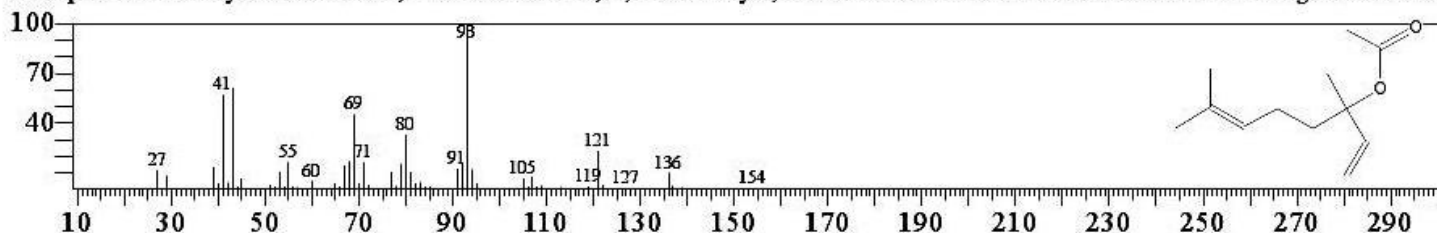


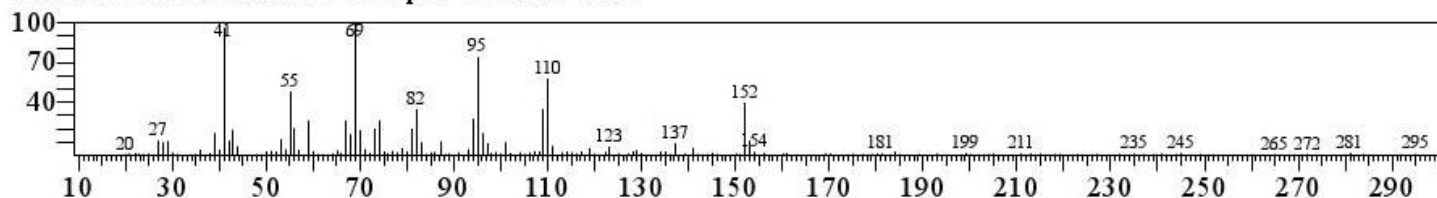
Figura 51. Espectro de la estructura del acetato de linalilo

<< Target >>

Line#:40 R.Time:48.290(Scan#:9059) MassPeaks:190

RawMode:Averaged 48.285-48.295(9058-9060) BasePeak:69.05(3157)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:15709 Library:NIST14s.lib

SI:85 Formula:C11H20O2 CAS:2270-60-2 MolWeight:184 RetIndex:1203

CompName:6-Octenoic acid, 3,7-dimethyl-, methyl ester \$\$ Methyl citronellate \$\$ Methyl 3,7-dimethyl-6-octenoate \$\$

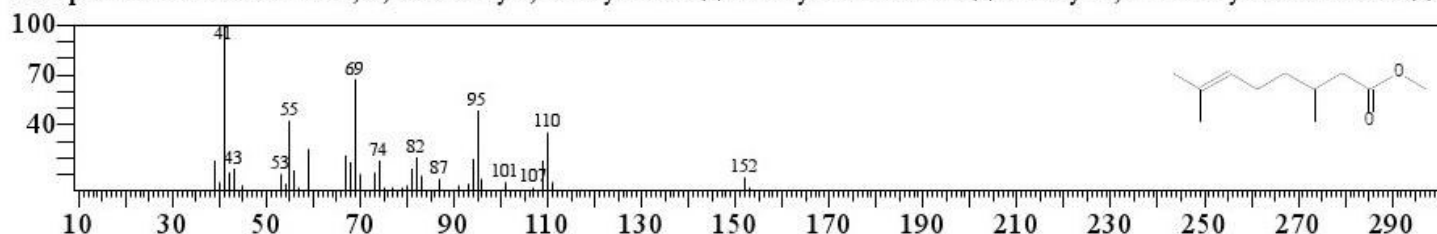


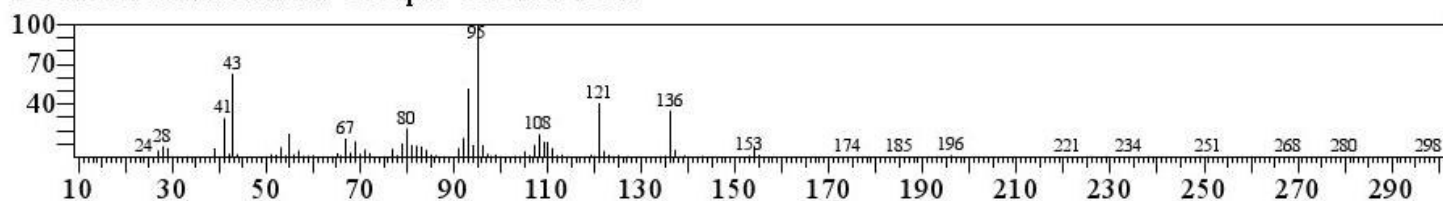
Figura 52. Espectro de la estructura del 3,7-dimetil-6-en- octato de metilo

<< Target >>

Line#:41 R.Time:49.375(Scan#:9276) MassPeaks:164

RawMode:Averaged 49.370-49.380(9275-9277) BasePeak:95.05(12392)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:17809 Library:NIST14s.lib

SI:95 Formula:C12H20O2 CAS:76-49-3 MolWeight:196 RetIndex:1277

CompName:Borneyl acetate \$\$ Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl-, acetate, endo- \$\$ Borneol, acetate \$\$ Borneyl

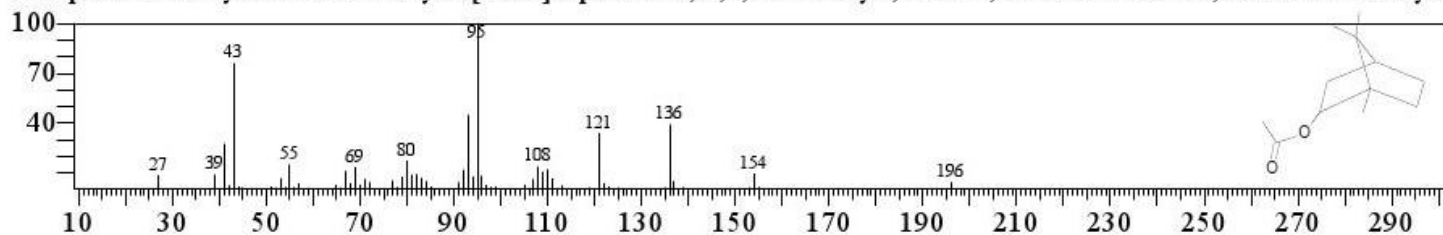


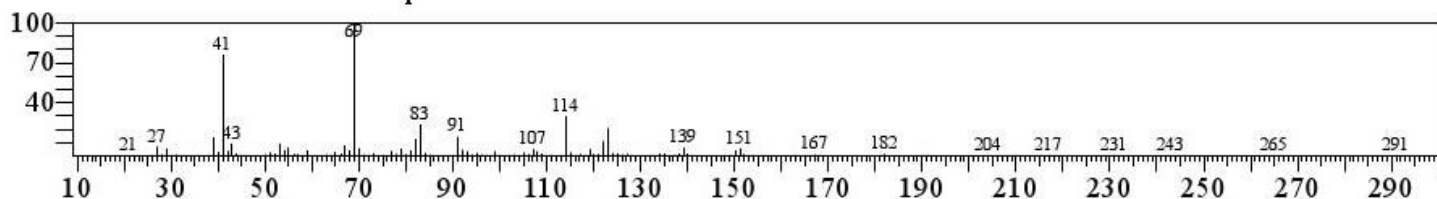
Figura 53. Espectro de la estructura del acetato de bornilo

<< Target >>

Line#:42 R.Time:51.195(Scan#:9640) MassPeaks:197

RawMode:Averaged 51.190-51.200(9639-9641) BasePeak:69.05(35006)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:15400 Library:NIST14s.lib

SI:85 Formula:C11H18O2 CAS:2349-14-6 MolWeight:182 RetIndex:1252

CompName:2,6-Octadienoic acid, 3,7-dimethyl-, methyl ester \$\$ Methyl geranate \$\$ Methyl geraniate \$\$ Methyl 3,7-di

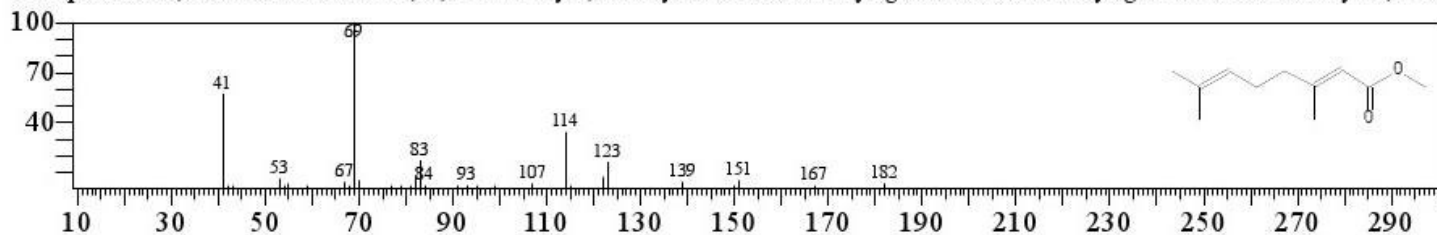


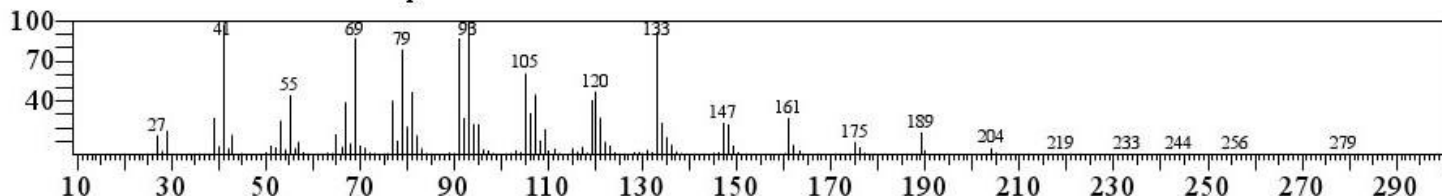
Figura 54. Espectro de la estructura del 3,7-dimetil-2,6-dien- octato de metilo (geranato de metilo)

<< Target >>

Line#:43 R.Time:55.070(Scan#:10415) MassPeaks:175

RawMode:Averaged 55.065-55.075(10414-10416) BasePeak:93.05(11394)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:19087 Library:NIST14s.lib

SI:95 Formula:C15H24 CAS:87-44-5 MolWeight:204 RetIndex:1494

CompName:Caryophyllene \$\$ Bicyclo[7.2.0]undec-4-ene, 4,11,11-trimethyl-8-methylene-, [1R-(1R*,4E,9S*)]- \$\$ Bicy

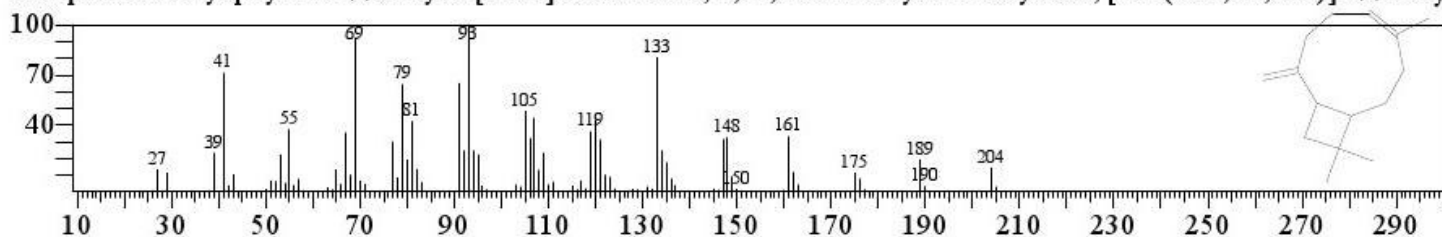


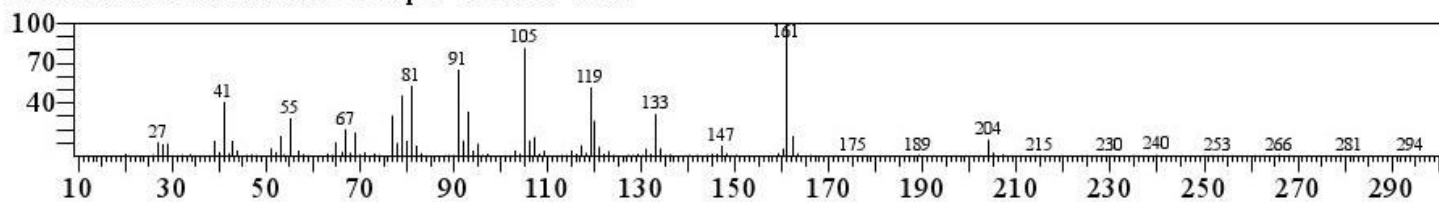
Figura 55. Espectro de la estructura del cariofileno

<< Target >>

Line#:44 R. Time:57.445(Scan#:10890) MassPeaks:178

RawMode:Averaged 57.440-57.450(10889-10891) BasePeak:161.10(6744)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:19185 Library:NIST14s.lib

SI:93 Formula:C15H24 CAS:23986-74-5 MolWeight:204 RetIndex:1515

CompName:Germacrene D \$\$ (S,1Z,6Z)-8-Isopropyl-1-methyl-5-methylenecyclodeca-1,6-diene \$\$ D-Germacrene \$\$ 1

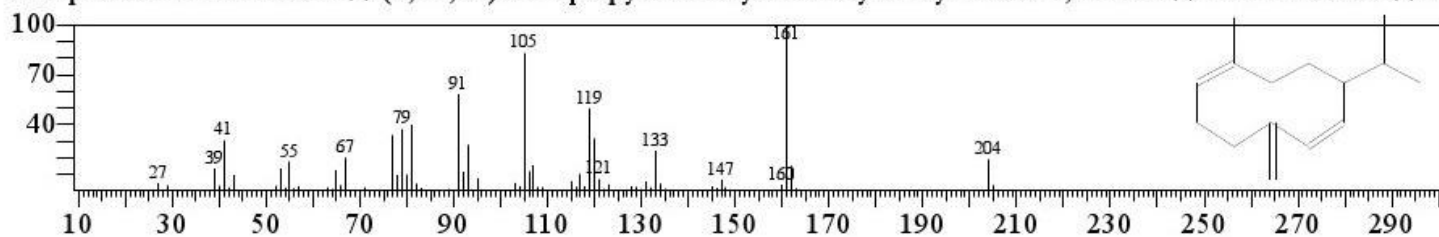


Figura 56. Espectro de la estructura del germacreno D

4.1.5. Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”

4.1.5.1. Método del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 5 de los ensayos de la actividad antioxidante del aceite de panizara y Trolox

Tabla 5. Resultados de la actividad antioxidante del aceite esencial de panizara y Trolox por el método del DPPH

Muestra	Concentración (µg/mL)	Promedio Absorbancia a 517 nm	% Inhibición DPPH
Blanco	0	0,701	0
Trolox	1,2	0,603	14,03
	3,6	0,322	54,00
	7,2	0,071	89,90
Aceite esencial de panizara	163	0,459	2,559
	326	0,441	6,306
	652	0,404	14,173
	1000	0,361	23,261
	1666,667	0,288	38,805
	2333,333	0,241	48,834

- El IC₅₀ obtenido para el aceite esencial de panizara fue de 2288,31 µg/mL y 3,8 µg/mL para el Trolox .(Ver figuras 57 y 58)

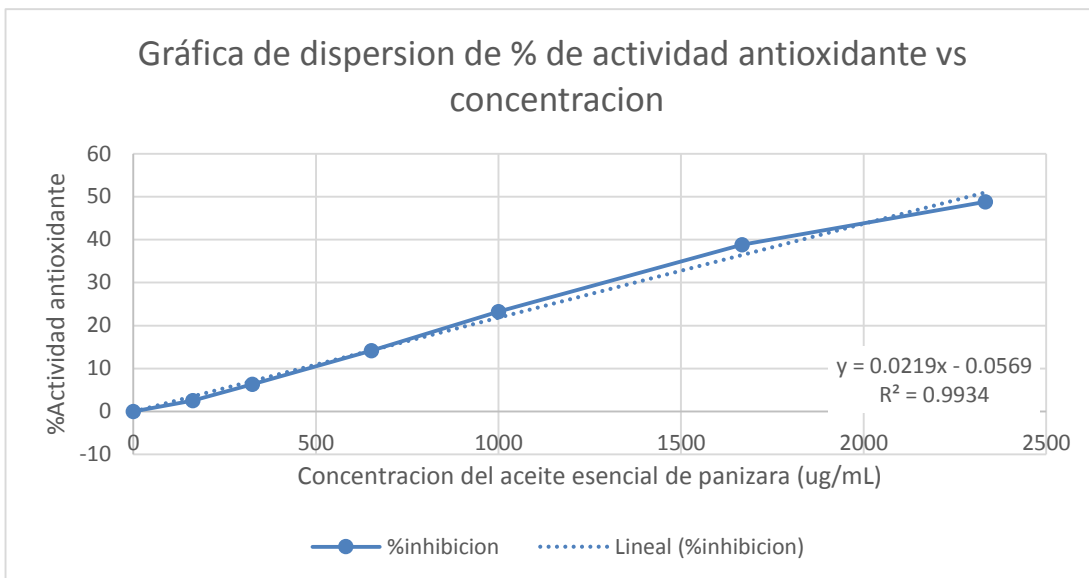


Figura 57. Gráfica de dispersión entre el porcentaje de actividad antioxidante versus concentraciones del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”

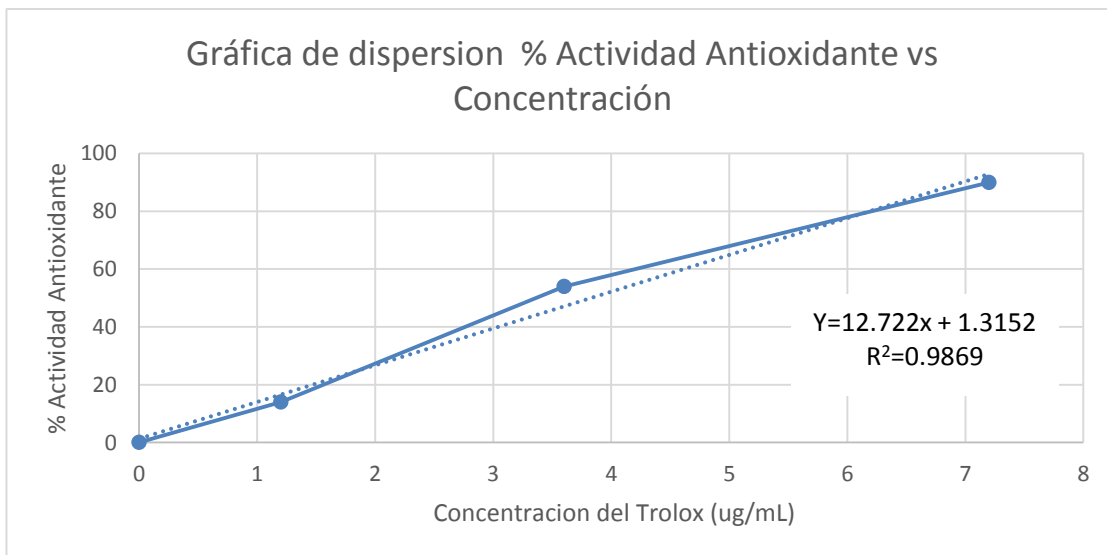


Figura 58. Gráfica de dispersión entre el porcentaje de actividad antioxidante versus las concentraciones del Trolox

4.1.5.2. Método del radical ABTS^{•+} (2,2-azinobis[3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato])

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 6 de los ensayos de la actividad antioxidante del aceite esencial de panizara y Trolox

Tabla 6. Resultados de la actividad antioxidante del aceite esencial de panizara y Trolox por el método del radical ABTS^{•+}.

Muestra	Concentración (µg/mL)	Promedio Absorbancia a 734 nm	% Inhibición ABTS^{•+}
Blanco	0	0,689	0
Trolox	1,2	0,610	12,14
	3,6	0,561	19,20
	7,2	0,522	24,78
	10,0	0,457	34,23
Aceite esencial de panizara	2,5	0,640	7,067
	5,0	0,618	10,381
	10,0	0,564	18,096
	20,0	0,466	32,434

- El IC₅₀ obtenido para el aceite esencial de panizara fue de 30,87 µg/mL y 17,04 µg/mL para el Trolox . (Ver figuras 59 y 60)

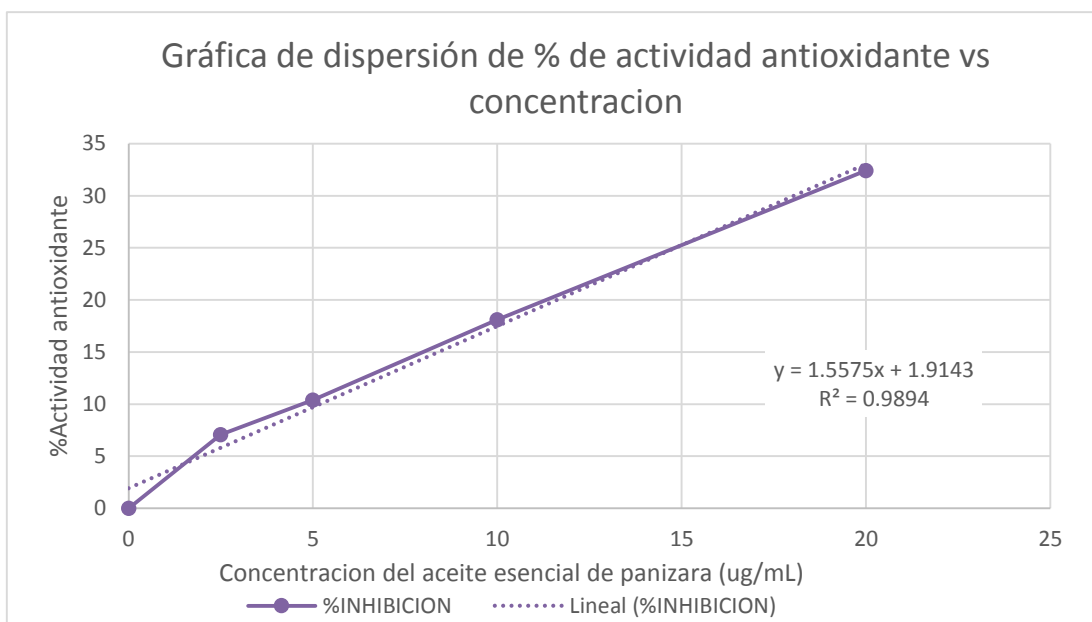


Figura 59. Gráfica de dispersión entre el porcentaje de actividad antioxidante versus concentraciones del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”

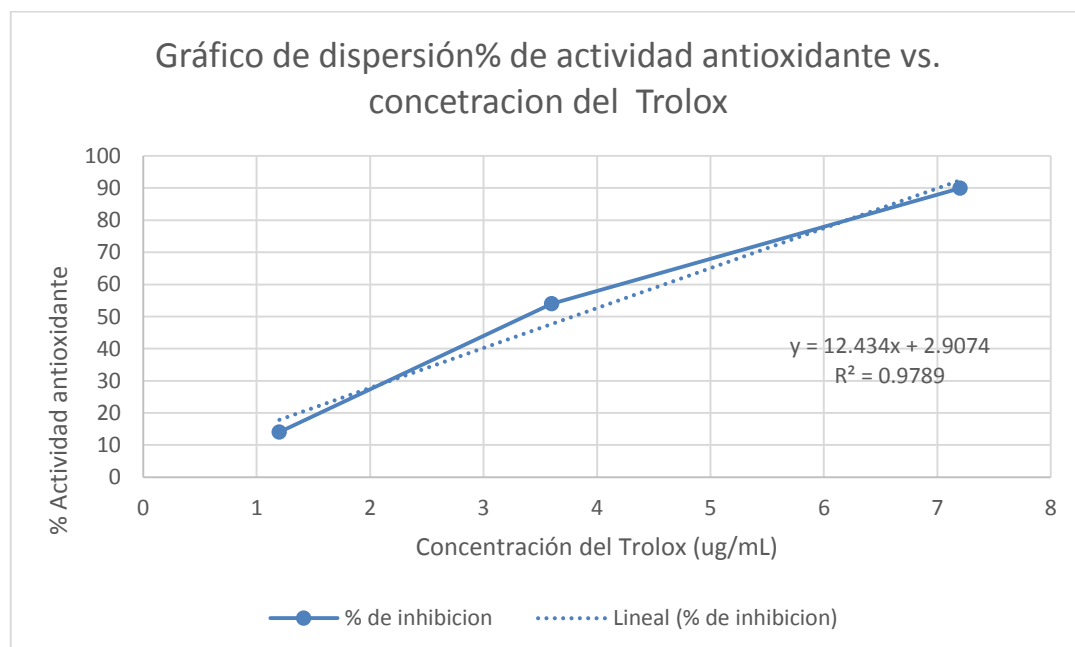


Figura 60. Gráfica de dispersión entre el porcentaje de actividad antioxidante versus concentraciones del Trolox

4.1.6. Evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial frente a *Candida albicans*

Los resultados obtenidos se clasificaron de acuerdo a las concentraciones utilizadas del aceite esencial. (Ver tabla 7)

Tabla 7. Resultados de la actividad antifúngica del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” frente a *Candida albicans* empleando el método de difusión en agar

MUESTRA	CONCENTRACIÓN	<i>Candida albicans</i> (halos de inhibición en mm)
Aceite esencial de Panizara	100%	25
	75%	23
	50%	21
	25%	16
Control positivo	Nistatina	38
Control negativo	Etanol 96°	Inactivo

4.2. Discusión

A partir de 5 kg de hojas frescas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”, proveniente del distrito de Huacaschuque, provincia de Pallasca, capital Cabana, región Ancash, se obtuvo un rendimiento del 0,58 por ciento v/p; mientras que Carhuapoma et al. (2014), reportó un rendimiento del aceite esencial de panizara del 1,00 por ciento v/p, esta diferencia puede deberse a diversos factores, como ecológicos, climáticos y edafológicas que influyen en el rendimiento y en la calidad del aceite esencial (Crop & Food Research, 2001)

Stashenko (2009), aclara que el rendimiento del aceite esencial es una característica trascendental desde el punto de vista económico y de rentabilidad del proceso de su obtención, puede variar desde 0,01% hasta el 4%; al comparar con nuestro resultado podemos indicar que el rendimiento obtenido es óptimo ya que se encuentra dentro del rango.

Los datos obtenidos en el análisis preliminar y las constantes fisicoquímicas del aceite esencial de panizara como la solubilidad, densidad, índice de refracción y el pH, indican que presentan características fisicoquímicas propias de los aceites esenciales (Domínguez, 1985).

La densidad obtenida del aceite esencial de las hojas de “panizara” a 21°C fue de 0,978 g/mL, siendo el valor cercano a lo reportado en el estudio del aceite esencial de *Satureja pulchella* “panizara” realizado por Carhuapoma et al. (2014) de 0,980 g/mL.

El índice de refracción obtenido a 21°C fue 1,475; resultado inferior a lo encontrado por Carhuapoma et al. (2014) de 1,494; debemos considerar que de acuerdo a lo reportado por Pérez (2006), los aceites esenciales poseen un índice de refracción promedio de 1,50.

En cuanto a la composición química determinada por Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas (CG/EM), se han elucidado 44 compuestos químicos según lo reportado en la tablas 3 y 4, conformados por 15 hidrocarburos monoterpénicos como alfa-pineno , canfeno, beta-felandreno, beta-pineno, beta-mirceno, 1-metil-4-(1-metiletilideno) ciclohexeno (Terpinoleno), ocimeno, D-limoneno, trans-beta-ocimeno, 3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno-(Z) [(Z)-Ocimeno], gamma-terpineno, 2-careno, 4-metil-1-(1-metiletil) ciclohexeno (p-menteno), 1,7,7-trimetil Triciclo [2.2.1.0(2,6)] heptano, 2-metil-5-(1-metiletil) biciclo [3.1.0] 2-hexeno; 15 monoterpenos oxigenados como eucaliptol , linalool, citronelal, endo-borneol, terpinen-4-ol, alfa-terpineol, 4-(1-metiletil) benzaldehído (cuminaldehído), acetato de bornilo, acetato de linalilo, 2-metil-5-(1-metiletil)-(1.alfa.,2.alfa.,5.alfa) biciclo [3.1.0] 2-hexanol, 2-metil-5-(1-metiletil)-(1.alfa.,2.beta.,5.alfa) biciclo [3.1.0] 2-hexanol, 2-metil butanoato de (2-metil) butilo, 3-metil butanoato de (2-metil) butilo, acetato de 3-octilo, 6,6-dimetil biciclo [3.1.1] 2-hepten-2-carboxaldehído; 2 hidrocarburos sesquiterpénicos como cariofileno, germacreno D; 6 ésteres como 2-metil butanoato de metilo, 2-metil butanoato de etilo, 3-metil butanoato de etilo, acetato de (2-metil) butilo, 3,7-dimetil-6-en- octato de metilo, 3,7-dimetil-2,6-dien- octato de metilo (Geranato de metilo); 2 alcoholes cíclicos como 6,6-dimetil- 2-metileno-[1S-(1.alfa.,3.alfa.,5.alfa)] Biciclo [3.1.1] 3-heptanol, 6,6-dimetil Biciclo [3.1.1]2-hepten-2-ol; 2 hidrocarburos cíclicos como 2,5-Norbornadieno, 1,3,3-trimetil-2-etenil ciclohexeno; 1 alcanos como 2,4-dimetil hexano y 1 compuesto heterocíclico aromático como el 2-etil furano.

La acción antimicrobiana de los componentes de los extractos vegetales y de los aceites esenciales se debe al carácter lipofílico de su esqueleto de hidrocarburos y principalmente al carácter hidrofílico de sus grupos funcionales (Kalembe y Kunicka, 2003).

El linalool, posee grupo funcional alcohol, es un antimicrobiano moderado, estomacal y carminativo (Kuklinski, 2003); además, es muy empleada en las industrias farmacéutica y perfumero cosmético (Hansel y Sticher, 2004)

Existen diversos trabajos de investigación de otras especies que pertenecen al mismo género, como el reportado por Carhuapoma (2007) del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling “urqu muña” muchos de los compuestos encontrados en el aceite esencial de urqu muña son comunes a los encontrados en el aceite esencial de panizara de la presente investigación como por ejemplo alfa-pineno, beta-pineno, beta-mirceno, D-limoneno, eucaliptol, cariofileno, terpineol. Así también se puede citar la investigación realizada del aceite esencial de *Satureja brownei* Briq. (Jaramillo et al., 2010), donde se elucidaron compuestos químicos que son comunes a los identificados en el aceite esencial de la panizara representados por alfa-pineno, beta-pineno, beta-mirceno, D-limoneno, eucaliptol, beta-felandreno, terpineol, linalol, cariofileno.

Altun y Goren (2013), publicaron los resultados de la investigación que realizaron sobre la composición química del aceite esencial de la *Satureja cuneifolia*, reportando del total de los compuestos elucidados tres compuestos químicos que son comunes a los identificados en el aceite esencial de la panizara, representados por cimeno, gamma-terpineno, beta-mirceno.

Según lo reportado Carhuapoma et al. (2014), realizó un estudio cualitativo de la caracterización química del aceite esencial de *Satureja pulchella* “panizara”, empleando una serie de reacciones químicas con determinados reactivos encontrando los siguientes compuestos químicos: pulegona, cimeno, carvacrol, acetato de bornilo y pineno. De los compuestos identificados tres compuestos químicos son comunes a los elucidados en el aceite esencial de la presente investigación representados por cimeno, acetato de bornilo y pineno. Sin embargo, es importante resaltar que la presente investigación es cuantitativa, además la metodología que se ha utilizado es la Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas (CG/EM), un método instrumental que nos garantiza resultados más certeros.

Las especies de *Satureja* de varios países han mostrado composición variable de su aceite esencial, particularmente, en sus hojas (Jaramillo et al., 2010).

En relación a la evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de las hojas frescas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”, fue realizado mediante dos métodos: captación del radical DPPH y captación del radical ABTS^{•+}. En el método de la capacidad captadora del radical DPPH, el aceite esencial de panizara presenta un IC₅₀ = 2288,31 µg/mL (Figura 57) y el patrón de referencia Trolox exhibe un IC₅₀ = 3,8 µg/mL (Figura 58); mientras que en el método de la capacidad captadora del radical ABTS^{•+}, se obtiene un IC₅₀ = 30,87 µg/mL (Figura 59) del aceite esencial de “panizara” y el patrón de referencia Trolox presenta un IC₅₀ = 17,04 µg/mL (Figura 60). De acuerdo a los resultados obtenidos podemos afirmar que el aceite esencial de panizara presenta actividad antioxidante variable; así tenemos cuando dicha actividad es determinada por el ensayo de la capacidad captadora del radical DPPH, resulta una actividad antioxidante no significativa frente al patrón estándar Trolox. Asimismo, podemos señalar cuando evaluamos la actividad antioxidante del aceite esencial de panizara por el el ensayo de la capacidad captadora del radical ABTS^{•+}, se obtiene una actividad antioxidante significativa frente al patrón estándar Trolox. Schlesier et al.(2002), hacen referencia que dada la complejidad química de los aceites esenciales, la prueba de la actividad antioxidante puede arrojar resultados diferentes dependiendo del método empleado. Por lo tanto es aconsejable un enfoque con múltiples ensayos. El autor agrega que entre la lista de métodos que pueden usarse para la evaluación de la actividad antioxidante muy pocos de ellos son útiles para determinar la actividad de ambas especies (hidrofílicas y lipofílicas) y asegurar así una mejor comparación de los resultados.

Según Arnao (2000) y Antolovich et al. (2002), señalan que el método del ABTS puede medir la actividad antioxidante de compuestos de naturaleza tanto hidrofílica como lipofílica. Kuskoski et al. (2005), hacen referencia que el método del ABTS es uno de los más rápidos, originando resultados reproducibles y coherentes. Además los autores agregan que el radical ABTS^{•+} presenta una buena solubilidad, permitiendo el ensayo de compuestos tanto de naturaleza lipofílica como hidrofílica.

Carhuapoma (2007) al realizar la evaluación de la actividad antioxidante por el método del DPPH del aceite esencial de *Satureja brevicalyx Epling* “urqu muña”, obtiene un $IC_{50} = 28,84 \mu\text{g/mL}$ e indica que el aceite esencial de “urqu muña” muestra actividad antioxidante comparado con el Trolox, así mismo agrega que dicha actividad se debe a las estructuras moleculares de sus constituyentes químicos y que posiblemente el gamma-terpineno que está presente en el aceite esencial de “urqu muña”, esté dotándole de dicha actividad antioxidante. Debo señalar que la molécula que hace referencia el autor también se ha identificado en el aceite esencial de panizara, lo que reafirma que dicho aceite esencial sí presenta actividad antioxidante. Según Sacchetti et al., (2005) hace referencia que los metabolitos antioxidantes en plantas son estudiados principalmente en base a sus estructuras polifenólicas, existe en la literatura científica que también se halla actividad antioxidante en los aceites esenciales cuyos componentes principalmente son terpenos.

La actividad antioxidante podría relacionarse a la presencia de monoterpenos como gamma-terpineno y limoneno que posee buena actividad antioxidante (Wei y Shibamoto, 2007; Conforti et al., 2007). Al comparar con nuestro resultado debo señalar que las moléculas que hace referencia los autores se han logrado identificar en la presente investigación, lo que corrobora que el aceite esencial de panizara presenta actividad antioxidante.

Según Choi et al., (2014), reportan que el linalool y el alfa-pineno posee capacidad de captación del radical DPPH entre 18,7-22,4%, estas moléculas que hace referencia el autor se encuentran presentes en el aceite esencial de panizara, el linalool representa (3.48%) y el alfa-pineno (8.32%). Pero además el autor agrega que el alfa-terpineol, beta-mirceno, beta-pineno, D-limoneno y o-cimeno, muestran una actividad anti-radicalaria frente al DPPH entre 8.8-16.5% de captación. Debo señalar que estas moléculas también se han identificado en la presente investigación; lo que confirma una vez más que el aceite esencial de panizara posee actividad antioxidante.

Ruberto y Baratta (2000) ensayaron 100 compuestos puros de aceites esenciales en dos modelos de actividad antioxidante, usando como referente al alfa-tocoferol. Los compuestos puros que muestran acción antioxidante, se encuentran presentes en el aceite esencial de panizara como son: eucaliptol, alfa-pineno, beta-pineno, alfa-terpineol y beta-mirceno; que muestran una actividad antioxidante entre 3.2-34.9%, en orden ascendente.

Olivero (2010) investigó los componentes mayoritarios y su relación con la actividad antioxidante de la *Minthostachys mollis* “muña”, determinó la presencia de un monoterpeno como la pulegona y un sesquiterpeno germacreno-D; compuestos asociados con la actividad antioxidante. De estas dos moléculas que hace referencia el autor el germacreno-D, se logró identificar en el aceite esencial de la panizara.

Considerando los resultados variados de la actividad antioxidante del aceite esencial de las hojas panizara y comparando con las investigaciones realizadas a otras especies vegetales, podemos confirmar que el aceite esencial de panizara presenta actividad antioxidante, está podría deberse a los siguientes terpenos identificados en el aceite esencial como son: linalool, D-limoneno, gamma-terpineno, alfa-pineno, alfa-terpineol, beta-mirceno, beta-pineno, ocimeno, eucaliptol, germacreno-D; que actuarían en sinergismo, potenciando su capacidad antirradicalaria, dando una protección a las macromoléculas biológicas, como las proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos.

En la investigación de la actividad antifúngica por los resultados obtenidos (Tabla 7) se ha demostrado que el aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” posee actividad significativa frente a *Candida albicans* en las concentraciones de 50%, 75% y 100% que equivalen a 48,9 mg; 73,35 mg; 97,8 mg respectivamente de aceite esencial de panizara frente a *Candida albicans*. Esta actividad podría atribuirse a la presencia de ciertos terpenos presentes en su composición química.

Shane (1979), refiere que existen varios estudios que han demostrado que los terpenoides son los principales constituyentes de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, siguiendo en orden de actividad los terpenoides que contienen grupos fenoles y alcoholes, luego los que poseen aldehídos y por ultimo los que tienen grupos cetónicos. Por ejemplo, indica que el aceite esencial de *Lemon grass* posee cantidades considerables de alfa-citral, beta-citral, citronelol, citronelal, linalool y geraniol, los cuales han mostrado poseer actividad antimicrobiana ante *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*.

Shane (1979) y Ilkka et al. (1998) señalan que el mecanismo específico de los terpenoides aún hoy no ha sido claramente caracterizado. Aunque actualmente se propone como posible sitio de acción la membrana celular donde los terpenoides surtirían efecto desencadenando una serie de procesos que podrían arribar a la muerte microbiana.

La actividad antimicrobiana del limoneno y gamma-terpineno, pueden atribuirse a que producen efectos en la integridad de membrana de las bacterias y hongos en consecuencia inhiben la respiración y afectan el proceso de transporte de iones (Martins et al., 2000)

Existe diversas investigaciones donde se señala que la actividad antimicrobiana de las mezclas químicas complejas que constituyen los aceites esenciales, ha llevado a intentos de identificar y aislar los componentes antimicrobianos activos. En muchos casos, los componentes o fracciones responsables de la actividad antibacteriana se han identificado como terpinen-4-ol en *Melaleuca alternifolia* “árbol de té” (Carson et al., 2002), carvacrol y timol en aceite de orégano (Lambert et al., 2001), y carvacrol y eugenol en el aceite de *Eugenia caryophyllata* “clavo de olor” (Chaieb et al., 2007).

En el estudio realizado por Cano (2007) con el aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” demostró actividad antimicótica *in vitro* frente a las cepas de *Candida albicans* a las concentraciones de 50 y 100 por cien y frente a los dermatofitos *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* y

Trichophyton tonsurans; son sensibles en los volúmenes de 5 y 50 mL; encontrándose en el aceite esencial los siguientes componentes químicos: Pulegona, mentona y limoneno.

Al realizar el estudio del *Eucalyptus globulus* “eucalipto” se obtiene aceite esencial, extractos e infusiones con actividad antifúngica, a concentraciones entre el 54% y el 95% del componente activo 1,8-cineol (World Health Organization, 2002).

La actividad antifúngica significativa que posee el aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” frente a *Candida albicans*, se debería a la presencia de los terpenoides que se encuentran presentes en la composición química del aceite esencial de panizara y que actuarían en sinergismo. Entre los terpenos responsables de esta actividad antifúngica, podría atribuirse a la presencia de linalool, terpinen-4-ol, endo-borneol, citronelal, eucaliptol, gamma-terpineno, D-limoneno.

CONCLUSIONES

1.-En el aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”, se identificaron 44 compuestos químicos, conformados por 15 hidrocarburos monoterpénicos, 15 monoterpénos oxigenados, 2 hidrocarburos sesquiterpénicos, 6 ésteres, 2 alcoholes cíclicos, 2 hidrocarburos cíclicos, 1 alcano y 1 compuesto heterocíclico aromático. Siendo los de mayor concentración el 1,3,3-trimetil-2-etenil ciclohexeno (46,84%), alfa-pineno (8,32%), beta-felandreno (8,27%)y el beta-mirceno (6,96%).

2.- En la actividad antioxidante del aceite esencial realizada mediante los ensayos de la capacidad captadora del radical DPPH y ABTS^{•+}; los resultados señalan que el aceite esencial presenta actividad antioxidante variable, por el método DPPH resulta tener una actividad antioxidante no significativa frente al patrón estándar Trolox. Por el método del radical ABTS^{•+}, se obtuvo una actividad antioxidante significativa frente al patrón estándar Trolox. La actividad antioxidante se debería a la presencia de los siguientes terpenos identificados en el aceite esencial de panizara como son: linalool, D-limoneno, gamma-terpineno, alfa-pineno, alfa-terpineol, beta-mirceno, beta-pineno, ocimeno, eucaliptol, germacreno-D; que actuarían en sinergismo, potenciando su capacidad antirradicalaria, dando una protección a las macromoléculas biológicas, como las proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos.

3.- El aceite esencial presenta actividad antifúngica significativa frente a *Candida albicans* en las concentraciones de 50%, 75% y 100%. La actividad antifúngica se debería a la presencia de los siguientes terpenos identificados en el aceite esencial de panizara como son: linalool, terpinen-4-ol, endo-borneol, citronelal, eucaliptol, gamma-terpineno, D-limoneno; que actuarían en sinergismo.

RECOMENDACIONES

- 1.-De acuerdo a lo obtenido en el presente trabajo se recomienda evaluar la actividad de cada uno de los componentes del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”, y así determinar el componente con mayor actividad antioxidante y antifúngica.
- 2.-De acuerdo a los resultados obtenidos en la actividad anti-Candida se recomienda que en futuros estudios se desarrolle la formulación de una forma dermocosmética con sus respectivos estudios de estabilidad y eficacia.
- 3.-Realizar los estudios de toxicidad para cada uno de los componentes del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, NC. (2009). Actividad antioxidante de *Satureja macrostema*. Tesis para optar al Grado de Maestría en Ciencia de los Alimentos. Instituto Politécnico Nacional. México D.F.
- Amie D, Davidovic-Amié D, Beslo D, Trinajstic N. (2003). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica chemical acta CCACAA*; 76(1): 55-56
- Anchante, R. (1998). Estudio de la actividad antifúngica del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima.
- Angulo HP, Míguez SM. (1999). Radicales libres, estrés oxidativo y cáncer. Rol de los productos naturales. Edit. Revista de la Academia Peruana de Farmacia XIV; 35-50. Perú
- Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 127, 183-198
- AOAC. Official Methods of Analysis. 20 Th. Dr. George W. Latimer J, editor. 2016
- Arnao, M.(2002). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radical. *Trends Food Sci. Technol*; 11, 419-421
- Balz, F. (1994). Natural antioxidants in human health and disease. Academia Press Inc. New York
- Bandoni, A. (2000). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Edit. UNLP- CYTED. Buenos Aires.

- Baud O, Grene AE, Li J, Wang H, Volpe JJ, Rosenberg PA. (2004). Glutathione Peroxidase-Catalase Cooperativity Is Required for Resistance to Hydrogen Peroxide by Mature Rat Oligodendrocytes. *The Journal of Neuroscience*. 24(7): 1531-40
- Barja, G. (1997). Radicales libres y antioxidantes. En: cascales M. *Bioquímica y Fisiopatología del estrés oxidativa*. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia.
- Beckel R, Kingnert H, Lundgren B, Hall G, Walter G.(1985). Effect of maillard reaction products on the stability of minced herring in frozen storage. *J. Food. Sci.*, 50, 501-502
- Birben E, Murat U, Sackesen C, Erzurum S and Kalayci O.(2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal*; 5:9-19.
- Branchi B, Galli C, Gentili P. (2005). Kinetics of oxidation of benzyl alcohols by the cation and radicalcation of ABTS. Comparison with laccase-ABTS oxidations: an apparent paradox, *Org. Biomol. Chem.*, 3, 2604-2614.
- Bravo, L. (1998). Polyfenols Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev*; 56: 317-33
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales*. 2da. Edición. Zaragoza- España.
- Cano, C. (2007). Actividad antimicrobica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). Tesis para optar al Grado de Magister. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. Lima.
- Cao G, Prior R. (2000). Postprandial increases in serum antioxidant Capacity in older women. *J. Appl. Physiol*; 89: 877-83
- Cascales, M. (1997). *Bioquímica y Fisiopatología del estrés oxidativo*. Fundación José Casares Gil. España

Carhuapoma, M. (2006). Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray "arrayán". Tesis para optar al Grado de Maestría en Recursos Vegetales y Terapéuticos. UNMSM, Lima.

Carhuapoma, M. (2007). Composición química, actividad anti-*Helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling "urqu muña". Tesis para optar al Grado de Doctor en Farmacia y Bioquímica. UNMSM, Lima.

Carhuapoma M, López S, Veliz F, Inostrosa L, Yuli R, Carlos N. (2014). Composición química, actividad antioxidante y toxicidad aguda del aceite esencial de *Saturaje pulchella* "panizara". Theorema UNMSM. Volumen(1),57-63.

Carson CF, Mee BJ, Riley TV. (2002) Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, 1914-1920.

Castañeda B, Ramos E, Ibáñez L. (1983). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Revista Horizonte Médico*; 8(1): 56-72.

Castro, A.(2008). Composición química del aceite esencial de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "coca". Tesis para optar al Grado de Doctor en Farmacia y Bioquímica. UNMSM, Lima.

Chaieb K, Hajilaoui H, Zmantar et al. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytother. Res.*, 21, 501-506.

Choi HS, Song HS, Ukeda H, Sawamura M.(2000). Radical scavenging activities of *Citrus* essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J Agric Food Chem.*, 48, 4156-61

Ceci R, Reyes M, Duranti G, Dimauro Y, Quaranta F, Pittaluga M, Sabitini S, Caserotti P, Parisi P, Parisi A and Caporossi D.(2014). Oxidative stress responses to a graded maximal exercise test in older adults following explosive-type resistance training. *Redox Biology*. 2:65-72.

Contreras, N. (2002). Evaluación de la actividad antioxidante in vitro de algunos aceites esenciales en el proceso de peroxidación lipídica inducida por la radiación ultravioleta. Tesis de maestría en Química. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Bucaramanga. Colombia.

Conforti F, Statti GA, Tundis R, Loizzo MR and Manichini F. (2007). In vitro activities of *Citrus medica* cv. Diamante (Diamante citron) relevant to treatment of diabetes and Alzheimers disease. *Phytotherap. Res.*, 21, 427- 433

Crop & Food Research (2001). Essential oils and their production. New Zealand, Institute for Crop & Food Research Institute (39). Disponible en:

<http://www.crop.cri.nz/home/productsservices/publications/broadsheet/s/039essentialoils.pdf>

De la Cruz, JP. (2012). Actividad antimicrobiana, antioxidante y determinación de la composición química mediante Comatografía de Gases/ Espectrometría de Masas (CG/EM) de los aceites esenciales de 3 especies de piper nativas del Perú. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. Lima.

Deans SG, Svoboda KP. (1990). The Antimicrobial Properties of Marjoram (*Origanum majorana* L.) Volatil Oil. *Flavour and Fragrance Journal*; 5: 187-90.

Depeng W, Cederbaum A. (2003). *Alcohol, oxidative stress, and free radical damage*. *Alcohol Research & Health*; 27(4)277-84

Di Santo, R. (2010). Natural products as antifungal agents against clinically relevant pathogens. *Nat Prod Rep.* ; 27(7): 1084-98

Dimitrova, Z. (1993). Antiherpes effect of *Melissa officinales L.* extracts. *Acta Microbiol Bulg*; 29: 65-72.

Dominguez, X. (1985). Métodos de Investigación Fitoquímica. (3^{era} edición). Edit. Limusa, S.A.. México. 229-238

Fehér J, Csomós G, Vereckei A. (1987). Free radicals reactions in medicine. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

Fleschin S, Fleschin M, Nita S, Pavel E, Magearu V. (2000). Free radicals mediated proteins oxidation in biochemistry Roum. *Biotechnol. Lett*;5(6): 479-95

Fridovich, I. (1995). Superóxido radical and Superoxide Dismutasa *Ann. Rev Biochem*; 64: 97-112

Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. (1995). Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst*; 87 (23): 1767-1777

Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. (2011). *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol.*; 10(2): 112-22.

Guija E, Troncoso L. (2000). Radicales libres y envejecimiento. *Bol. Soc. Quim. Perú*; 45: 33-55

Guija E, Inocente M, Ponce J, Zarzosa E. (2015). Evaluación de la técnica 2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horiz Med* ; 15(1): 57-60

Grinsted, M. (1994). Types of antioxidants and their historical background. *Boletín técnico N° 13*, Dinamarca.

Hansel R y Sticher O. (2004). *Pharmakognosia-phytopharmazie 7th*. Springer-Verlag. Berlin;2004.

Huang, D. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem*, 53(6), 1841-56.

Instituto Cuencas. (2012). Conocimientos tradicionales de plantas medicinales en cajamarca. Perú.

International Life Sciences Institute. (1996). Antioxidants: scientific basis, regulatory aspects and industry perspectives. Summary of workshop held 8-9 february.

Jaramillo E, Stashenko E, Martinez J. (2010). Composición química volátil de *Satureja brownei* (Sw.) Briq Colombiana y determinación de su actividad antioxidante. *Revista cubana de plantas medicinales*. 15(1),

Joyeux M, Mortier F, Fleurentin J. (1995). *Phytother. Res*. 9,228.

Kalembe D, Kunicka A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal chemistry*.10(10), 813-829

Kim J, Sudbery P. (2011). *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol*; 49(2):171-77.

Kucera IS, Herrmann EC. (1967). Antiviral Substances in plants of the mint family (*Labiatae*). I *Tannin of Melissa officinalis*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*; 124: 865-69.

Kuklinski, C. (2003). Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Edit. Omega. Barcelona;2003

Kuskoski E, Asuero A, Troncoso A, Mancini J, Fett T.(2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Journal Food Science and Technology*, 25(4)

Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *J Phytother Res* ; 18: 435-48.

- Larrondo JV et. al. (1995). Antimicrobial activity of essences from labiates. *Microbios*; 82: 171-72.
- Lazo, W. (1983). Acción Antifúngica de *Allium sativum*. Boletín Micológico; 1: 185-86.
- Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJE. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, 91, 453-462.
- Lee K, Min DB. (2004). Reactive oxygen species, aging and antioxidants nutraceuticals. *Compreh Rev. Food Science and Food Safety*; 3: 21-33.
- Lobos, MT. (1997). Laboratorio de micología. Vol. 26 (N° 3)
- Lopez SN, Castelli MV, Zacchino SA, Dominguez JN, Lobo G, Charris- Charris J, Cortes JC, Ribas JC, Devia C, Rodriguez AM, Enriz RD. (2001). *In vitro* antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. *Bioorg Med Chem*; 9(8): 1999-2013.
- Maoz M , Neeman I. (1998). *Antimicrobial effects of aqueous plant extracts on the fungi Microsporum canis and Trichophyton rubrum and on there bacterial species Letters in Applied Microbiology*; 26: 61-3.
- Marklund, S. and Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of piragalol and convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. Biochemical*.
- Martínez, A. (2003). *Aceites esenciales. Universidad de Antioquía. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín. Colombia.*
- Martins R, Salgueiro M, Goncalves R, Vila F, Tomi T, Casanova J. (2000). Antimicrobial activity and chemical composition of the bark oil

of *Croton stellulifer*, an endemic species from S Tome e Pricipe, *Planta Med.*, 66, 647-650

Masada, Y.(1997). Analysis of Essential Oils by gas chromatography and Mass spectrometry, Ed, John Wiley, N.Y, 330 p.

Mc Cord, J. (1983). The Superoxide free radical: Its Biochemistry and pathophysiology. *Surgery* ;94 (83): 412-14

Meydani, M. (2000). Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. *Am. J. Clin. Nutr*; 71: 16665-85

Miller, E. (1967). *Fisiología vegetal*. 1° Edición. México D.F.: Editorial Centro Regional de Ayuda Técnica, 111-114

Moyes DL, Naglik JR. (2011). Mucosal immunity and *Candida albicans* infection. *Clin Dev Immunol.*; 2011:346307.

Navarro VM, Gonzalez A, Fuentes M, Aviles M, Rios MY, Zepeda G, Rojas MG. (2003). Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *J Ethnopharmacol*; 87 (1): 85-8.

Negroni, M. (1999). *Microbiología estomatológica*. Buenos Aires

Nenadis N, Wang L, Tsimidou M, Zhang H. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS. Assay. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4669-4674.

Niimi M, Firth NA, Cannon RD. (2010). Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology*; 98(1): 15-25.

Odio, CM. (2010). Tratamiento antifúngico en situaciones especiales:candidiasis resistente y aspergilosis. *Drugs Today (Barc)*; 46 Suppl C: 33-46.

Okoh SO, Iweriebor BC, Okoh OO, Nwodo UU, Okoh AI. (2016) Antibacterial and Antioxidant Properties of the Leaves and Stem

Essential Oils of *Jatropha gossypifolia* L. BioMed Research International. 1-9.

Olivero, J. (2010). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 20(4), 568-574

Pardi G, Cardozo EI. (2002). Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. Acta Odontológica Venezolana

Paredes O, Cervantes ML, Vigna M, Hernández T. (2010). *Berries improving human health and healthy aging, and promoting quality life- A review*. Plant Foods Human Nutr. 65(3): 299-308

Pérez, F. (2012). *Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas frescas de Eryngium foetidum L "siuca culantro"* Tesis Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM

Pérez, T.F. (2006). Efectividad de los vapores de tomillo y orégano como agentes antibacterianos. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas, Puebla, México

Pierce AM, Pierce HD, Unrau AM, Oehlschlager AC. (1978). Lipid composition and polyene antibiotic resistance of *Candida albicans*. Can J Biochem. 56: 135-142.

Pfaller, MA. (2012). Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. Am J Med.; 125(1 Suppl): S3-13.

Pharm-Huy LA, He H, Pharm-Huy C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. Int. J Biomed sci. 4(2): 89-96

Pokony J, Yanishlieva N, Gordon M, editors. (2001). Antioxidantes de los alimentos aplicaciones prácticas. España: Editorial Acribia

- Pretsch E, Buhlmann P, Affolter C, Herrera A, Martinez R. (2002). Determinación estructural de compuestos orgánicos. Masson.313
- Pryor, W. (1983). Oxyradicales and Related Species: Their Formations, Lifetime and reactions. Ann. Rev. Phys. 48:657-67
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, And Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology & Medicine.
- Riccioni G, Bucciarelli T, Mancini B, Di ilio C, Capra V, D´Orazio N.(2007). The role of antioxidant vitamin supplementation in the prevention of cardiovascular diseases. Expert Opin Investig Drugs. 16(1): 25-32
- Rodríguez J, Menéndez J, Trujillo Y. (2001). Radicales libres en la bio medicina y estrés oxidativa. Revista cubana Médica Militar; 30(1):36-44
- Rodríguez, M. (2006). Lamiaceae endémicas del Perú. Revista peruana de Biología; 13(2): 371-79.
- Rodríguez, J. (2014). Estructura química y actividad antioxidante in vitro del aceite esencial de *Eryngium foetidum* L. "siuca culantro". Tesis para optar al Grado de Magister en Ciencias de los Alimentos. UNMSM, Lima.
- Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. (2003). Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. J Ethnopharmacol; 88(2-3): 199-204.
- Rozo C, Mamone M. (1986). Vitaminas, Agentes Nutritivos y Terapéuticos. Ed. Doyma S.A. España
- Ruberto G, Baratta MT. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. Food chemistry, 69; 167-174

Sádaba B, García- Quetglas E, Azanza JR. (2004). Relación entre estructura y función en los azoles. *Revista Esp. Quimioterapia*. Vol. 17 (Nº 1); 71-78

Sagástegui A, Rodríguez E. (2012). Una nueva especie de *Salvia* (Lamiaceae) del Norte del Perú. *Revista peruana de Biología*; 13(2) : 139-42.

Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, Bruni R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobial in foods. *Food Chemistry*, Vol. 91, pag. 621-632

Schlesier K, Harwat M, Bohm V, Bitsch R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vivo methods; 36(2):177-187

Shahidi F, Janitha P, Wanasundara P. (1992). *Phenolic Antioxidants. Critical reviews un food science and nutrition*; 32(1): 67-103.

Shane, G. (1979). Aspects of antimicrobial activity of terpenoids and the relationship to their molecular structure. *Phisic Bulletin*.30, pp262

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R ,Williams DW, Azaredo J. (2012). *Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev.*; 36(2): 288-305.

Soto L, Ojeda G, Rojas L, Sulbarán B, Peña J, Berradre M., Fernandez V. (2013). Caracterización química del aceite esencial de toronja (*Citrus paradisi* L.) *Rev. Fac. Agron.* (3), 30, 266-283.

Simon OR, Singh N. (2001). Demonstration of anticonvulsant properties of an aqueous extract of *Erygium foetidum* L. *West Indian Med J.* 35(2): 121-5.

Stashenko, E. (2009). *Aceites esenciales* (1^{era} edición) Bucaramanga, Colombia

Suárez, S. (2014). Actividad captadora de radicales libres y efecto antioxidante de metabolitos secundarios del extracto acuoso del *Allium sativum var Huaralino (ajo)*. Tesis para optar al Grado de Doctor en Farmacia y Bioquímica. UNMSM, Lima.

Tafur GG, Martínez JR, Stashenko EE. (2005). Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales en emulsiones degradadas por radiación ultravioleta. *Revista Colombiana de Química*; 34(1): 43-55.

Tchakam PD, Lunga PK, Kowa TK, Lonfouo AH, Wabo HK, Tapondjou LA, Tané P, Kuate JR. (2012). Antimicrobial and antioxidant activities of the extracts and compounds from the leaves of *Psorospermum aurantiacum Engl and Hypericum lanceolatum Lam.* *BMC Complement Altern Med.*; 12(1):136

Termentzi A, Fokialakis N, Skaltsounis L. (2011). Natural resins and bioactive natural products thereof as potential antimicrobial agents. *Curr Pharm Des.*; 17(13): 1267-90

Tiskow, G. (1996). *Radicales Libres en Biología y Medicina: Una Breve Revisión.* *Gac. Cient. Vet*; 1: 44-57

Vásquez O, Alva A, Marreros J. (2001). *Extracción y caracterización del aceite esencial de jengibre (Zingiber officinali)* . *RAIA*; 1(1): 38-42.

Velazquez, D. (1997). Clave para los Géneros de *Lamiaceae* en Venezuela. *Acta Botánica Venezuéllica*; 20(1) : 1-5

Volk WA, Benjamin DC, Kadner RJ, Parsons JT.(1989). *Microbiología Médica.* Interamericana Mc Graw-Hill. 3ra Edición, pp. 533-560

Webb BC, Thomas CJ, Willcox MDP, Harry DWS, Knox KW. (1998). *Candida*- associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. *Aust Dent J.* 43: 45-50

Weisburger, JH. (1999). Mechanism of action of antioxidants as exemplified in vegetables, *tomatoes* and *tea*. *Food Chem. Toxicol*; 37(9/10): 943-8

Wei and Shibamoto. (2007). Antioxidant activities of volatile constituents of various essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 1737-1742.

World Health Organization. (2002). *Folium Eucalypti*. *WHO monographs on selected medicinal plants*. *WHO Graphics*. Ginebra; 106-113.

Zacchino, S. (2001). *Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos*. En: Yunes and Calixto eds. *Plantas como fontes de novos medicamentos*. SC, Brasil.

Anexo 1 (Clasificación botánica)



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
 Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
 VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

CONSTANCIA N° 234-USM-2017

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (tallo, hojas y flor) recibida de **Edgard Robert TAPIA MANRIQUE**, ha sido estudiada y clasificada como: ***Clinopodium pulchellum*** (Kunth) Govaerts, **Sin.: *Satureja pulchella*** (H.B.K.) Briq. y tiene posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ASTERIDAE

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: LAMIACEAE

GENERO: *Clinopodium*

ESPECIE: *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts.


Sin. : *Satureja pulchella* (H.B.K.) Briq.

Nombre vulgar: "panizara"

Determinado por Mg. Asunción Cano Echevarría.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que considere pertinente.

Lima, 23 de octubre de 2017


Mg. Asunción A. Cano Echevarría
 JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ANEXO 2 (Certificado de Analisis Cromatografia de Gases/Espectrometría de Masas)



UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS
LABICER (Laboratorio N° 12)
ANÁLISIS QUÍMICO, CONSULTORÍA E INVESTIGACIÓN

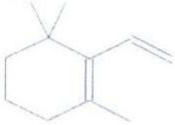


INFORME TÉCNICO N° 1452 – 17 – LAB. 12

1. **DATOS DEL SOLICITANTE**
 - 1.1 EMPRESA SOLICITANTE : UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
 - 1.2 RUC : 20148092282
2. **CRONOGRAMA DE FECHAS**
 - 2.1 FECHA DE RECEPCIÓN : 11 / 10 / 2017
 - 2.2 FECHA DE ENSAYO : 12 / 10 / 2017
 - 2.3 FECHA DE EMISIÓN : 13 / 10 / 2017
3. **ANÁLISIS SOLICITADO** : ANÁLISIS DE ACEITE ESENCIAL
4. **DATOS REFERENCIALES DE LA MUESTRA**
 - 4.1 IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA : 01 MUESTRA DE ACEITE ESENCIAL DE CLINOPODIUM PULCHELLA "PANIZARA"
5. **LUGAR DE RECEPCIÓN** : LABORATORIO LABICER - FACULTAD DE CIENCIAS
6. **CONDICIONES AMBIENTALES** : Temperatura: 23 °C; Humedad relativa: 58%
7. **EQUIPOS UTILIZADOS** :

CROMATÓGRAFO DE GASES. SHIMADZU, GC-2010 Plus.
AUTOMUESTREADOR: SHIMADZU, AOC-6000.
Detector de espectrometría de masas: SHIMADZU, GCMS-QP210 Ultra.
COLUMNA GC: RESTEK, RTX-5MS, 30m x 0.25 mm ID x 0.25 µm df. Serial: 1346249.
GAS CARRIER UTILIZADO: HELIO

8. RESULTADOS

ANÁLISIS CUALITATIVO (COMPONENTES VOLÁTILES)	COMPONENTE PRINCIPAL	MÉTODO DE REFERENCIA
	<i>Análisis de Componentes Volátiles - Inyección por Headspace (HS)</i>	
Aceite esencial de	Cyclohexene, 2 ethenyl-1,3,3-trimethyl  (Altura relativa: 46.84%)	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

*Ver en Anexos (Tabla N°1) la lista de compuestos de la muestra, obtenido por el software del equipo GCMSsolution de SHIMADZU utilizando la librería NIST.

9. OBSERVACIONES

Se encontraron 44 componentes volátiles en la muestra de aceite esencial de, siendo los componentes mayoritarios: Cyclohexene, 2 ethenyl-1,3,3-trimethyl (46.84%), alpha- Pinene (8.32%), beta-Phellandrene (8.27%), y beta-Myrcene (6.96%)

10. VALIDEZ DEL INFORME TÉCNICO

Los resultados de este Informe técnico son válido solo para la muestra proporcionada por el solicitante del servicio en las condiciones indicadas del presente informe técnico.


Bach. Jesús Utano Reyes
Analista
LABICER –UNI


MSc Otilia Acha de la Cruz
Responsable de Análisis
Jefa de laboratorio
CQP 202

(*) El Laboratorio no se responsabiliza del muestreo ni de la procedencia de la muestra.

ANEXO 3

Figura 1. Colecta del *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” en el distrito de Huacaschuque provincia Pallasca Ancash



Figura 2. Obtención del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”, por el método de destilación con arrastre de vapor de agua



Figura 3. Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”, por los métodos del DPPH y ABTS



Figura 4. Halos de inhibición producido por el aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”, frente a *Candida albicans*

