

**CARACTERIZACION DEL ACEITE ESENCIAL DE *Hyptis melissoides*
(Kunth, 1891) MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE GASES-MASAS
Y EVALUACION DE SU POTENCIAL ANTIMICROBIANO EN
Klebsiella pneumoniae y *Staphylococcus aureus***



ELCY ROCIO HERNÁNDEZ PEÑA

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL CAUCA
POPAYÁN
2011**

**CARACTERIZACION DEL ACEITE ESENCIAL DE *Hyptis melissoides*
(Kunth, 1891) MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE GASES-MASAS
Y EVALUACION DE SU POTENCIAL ANTIMICROBIANO EN
Klebsiella pneumoniae y *Staphylococcus aureus***



ELCY ROCIO HERNÁNDEZ PEÑA

Trabajo de grado como requisito para optar el título de Bióloga

Bióloga. CLARA INES GIRALDO
Directora

Mg. NELSON BOLIVAR ROJAS
Co-director

Mg. BERNARDO RAMIREZ
Asesor

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL CAUCA
POPAYÁN
2011**

NOTA DE ACEPTACION

Directora: _____

Biol. Clara Inés Giraldo

Jurado: _____

Mg. Diego Macías Pinto

Jurado: _____

Bact. Liliana Caldas Arias

Fecha de sustentación. 05 de Agosto del 2011

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico con todo mi amor
A DIOS *Por ser mi fortaleza, mi guía espiritual de mí*
Vida y permitirme dar este paso tan importante
Porque si el no hubieras estado en los momentos
Que necesité no lo hubiera logrado.

A MI MADRE *Por el gran apoyo y cariño*
Que me han brindado durante toda mi vida.

A MIS HERMANOS *Libardo Hernández, Julio Hernández*
Sonia Hernández, Piedad Hernández,
Ana Lucia Hernández.

A MI FAMILIA EN GENERAL *Con afecto sincero.*

A MIS AMIGOS Y *Por su amistad y apoyo hasta lograr la meta.*

Por último, quiero dedicar este trabajo **A LA PRESENCIA ESPIRITUAL** *de mi*
abuelito que me enseñó a luchar por los ideales.

AGRADECIMIENTOS

El agradecimiento más grande va para Dios por la posibilidad de descubrir personas tan valiosas a lo largo de mi vida, por darme la satisfacción de cumplir una meta tan grande acompañada de gente tan linda como es mi familia y amigos.

Agradezco en gran medida al profesor Nelson Bolívar Rojas por el apoyo y la confianza que deposito en mí para la realización de este trabajo.

A mi directora Clara Inés Giraldo quien compartió sus conocimientos y siempre estuvo atenta al buen desarrollo de la presente investigación.

A los profesores del departamento de Biología por ser formadores de personas, por el aporte de sus conocimientos, a Diego Macías Pinto, María Isaura Valdivieso; por mostrar el verdadero sentido de la vida universitaria, por su pasión por el conocimiento biológico; al profe Silvio Carvajal por su colaboración con la parte estadística; al profe Bernardo Ramírez por su colaboración en la identificación y suministración del material vegetal.

Al laboratorio de Biología especialmente a Darwin, Jhon y Betty. Infinitas gracias, por su enorme paciencia, consejos y buena disposición del laboratorio.

Al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud y en particular a Liliana Caldas y Gloria Ávila, por su carisma incondicional ayuda, en el intercambio de sus saberes y colaboración en la toma de la lectura de Elisa.

Mis más sinceros agradecimientos a la profesora Liliana Caldas, por ser una persona maravillosa que me acompañó incondicionalmente, compartió sus conocimientos y experiencias; por su paciencia, apoyo, sugerencias, por facilitarme el material del laboratorio... tantas cosas que permitieron la culminación de la presente investigación.

A mis compañeros de semestre por demostrar su cariño y apoyo, especialmente a Anny Meneses y Andresito Trujillo por ser mis verdaderos amigos.

A mis amigos que DIOS me puso al final de mi carrera por demostrarme que los verdaderos amigos no importan cuantos años uno los conozca sino que calidad de tiempo pase uno con ellos, por demostrarme que la amistad es mas que una palabra. Gracias a, Robinson Lizcano, Luz Elena Triana, Javier Collazos, Bety Piamba, Vianny Plaza.

A todos mis compañeros y profesores de los diferentes departamentos y facultades, quienes a diario emprenden la labor de transmitir sus saberes.

A mi familia, comenzando por mi madre, hermanos y sobrinos

Y a mi UNIVERSIDAD DEL CAUCA por permitir mi formación durante estos cinco años.

Finalmente a todos aquellos que de alguna forma ayudaron a la terminación de esta investigación.

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar la composición química del aceite esencial de *Hyptis melissoides* (Mastranto de Juanambú) determinar la efectividad antimicrobiana contra *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* mediante el método de antibiograma y microdilución.

El aceite esencial se obtuvo a partir de 1.341.20g de muestra seca mediante un sistema de hidrodestilación con arrastre de vapor de agua a temperatura y presión controlada, obteniéndose un rendimiento total de 0.22 % v/p. Se realizó un análisis de Cromatografía de Gases /Espectrometría de Masas (CG/EM) en cuyo cromatograma se identificaron compuestos como terpenos, esterés y Ester cíclicos.

Se determinó la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial mediante los métodos antibiograma y microdilución en caldo, mostrando un resultado estadísticamente significativo respecto a su actividad, frente a las cepas de importancia clínica *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. La capacidad de *H. melissoides* para inhibir el crecimiento de las bacterias probablemente radica en la alteración de membranas mediante 3 posibles vías: aumentando la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, afectando la estabilidad estructural de la membrana y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica, cualquiera de estos 3 efectos produce la muerte de células bacterianas. Puesto que los terpenos que se encontraron en *Hyptis melissoides* podrían afectar a las bacterias mediante estas posibles vías. La composición química del aceite esencial de *Hyptis melissoides* posiciona a esta especie vegetal como un prometedor antioxidante natural y como agente antibacteriano.

Palabras clave: *Hyptis melissoides*, actividad antibacteriana, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	6
1. MARCO TEORICO	11
1.1 <i>Hyptis melissoides</i>	11
1.1.1 Ubicación Taxonómica. <i>Hyptis melissoides</i>	11
1.1.2 Características morfológicas.....	12
1.1.3 Distribución Geográfica.....	133
1.1.4 Material Representativo	13
1.1.5 Situación Actual	133
1.2 ACEITES ESENCIALES	133
1.2.1 Clasificación.....	144
1.2.3 Aceites esenciales de <i>Hyptis</i>	155
1.3 CROMATOGRAFÍA DE GASES-MASAS	155
1.4 BACTERIAS.....	166
1.4.1 Morfología. Cápsula bacterina	166
1.5 TÉCNICAS PARA EVALUAR ACTIVIDAD BIOLÓGICA USANDO MICROORGANISMOS	20
1.5.1 1 Métodos de antibiograma basados en difusión.Técnica de difusión en agar (<i>método de Kirby-Bauer</i>).....	20
1.5.2 Métodos de antibiograma basados en dilución	20
2. ANTECEDENTES.....	21
2.1 COMPOSICIÓN	21
2.2.1 Atividad farmacologica de <i>Hyptis</i>	244
3. METODOLÓGIA	299
3.1 PROCEDENCIA DEL MATERIAL VEGETAL:	299
3.1.1 Protocolo extracción de aceite esencial:.....	30
3.1.2 Preparacion del material	31
3.1.3 Evaluación de la actividad biológica del aceite esencial en bacterias.....	333
3.1.4 Método de difusión en agar:.....	355

3.1.5 Método de microdilución en caldo.....	377
3.1.6 Analisis de los datos	399
4. RESULTADOS.....	40
4.1 RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL	40
4.1.2 Estandarizacion de la obtencion del aceite y hidrolato de <i>Hyptis melissoides</i>	40
4.1.3 Determinación de la composición química del aceite esencial de <i>Hyptis melissoides</i>	41
4.1.4 Prueba para método de difusión en agar	47
4.1.5 Analisis de resultados (<i>metodo kirby-bauer</i>)	48
4.1.6 Analisis de resultados prueba de microdilución en caldo.....	51
5. DISCUSIÓN	55
6. CONCLUSIONES	61
7. RECOMENDACIONES.....	63
8. BIBLIOGRAFIA.....	64
ANEXOS.....	75

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Fotografía A: arbusto, B. flor con anteras, de <i>Hyptis melissoides</i>	12
Figura 2 Pared en Bacterias Gram positivas	17
Figura 3 Pared en Bacterias Gram negativas	18
Figura 4 Fotografías de <i>Hyptis melissoides</i> : A. Planta mojada; B. Peso mojado; C. Planta seca; D Peso seco; E. Planta triturada; F. Preparación del material.	30
Figura 5 Destilación por arrastre con vapor y extracción continua utilizando como disolvente agua destilada.	31
Figura 6 Purificación del material por filtración al vacío	32
Figura 7 Filtración de Hidrolato por SWINNEX	33
Figura 8 Lectura de turbidez en la escala de Mac Farland	34
Figura 9 Montaje difusión en Agar	35
Figura 10 Incubación <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	36
Figura 11 Medición de halos de inhibición	37
Figura 12. Distribución de Microdilución en caldo.....	38
Figura 13 Lector de Elisa STAT FAA 3200 AWARENESS TECHNOLOGY INC ...	39
Figura 14 Aspecto del Aceite Esencial.....	41
Figura 15 Aspecto del Hidrolato.....	41
Figura 16 Cromatografía de Gases del Aceite Esencial de <i>Hyptis melissoides</i>	42
Figura 17 Cromatografía de Gases del aceite esencial de <i>Hyptis melissoides</i>	43
Figura 18 Cromatografía de la estructura Germacrene-D (C ₁₅ H ₂₄)	47
Figura 19 Cromatografía de la estructura Bicyclogermacrene (C ₁₅ H ₂₄)	47
Figura 20 Halo de inhibición (en mm) en cultivos de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> en presencia de aceite esencial de <i>H. mellisoides</i> a diferentes concentraciones.	48
Figura 21 Valores de Absorbancia de los cultivos de <i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> en presencia de aceite esencial de <i>H. mellisoides</i> a diferentes concentraciones.....	53

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Componentes de Aceites Esenciales de diferentes <i>Hyptis</i>	21
Tabla 2 Composición Química de los Componentes del Aceite Esencial de <i>Hyptis melissoides</i>	44
Tabla 3 Composición Química de los componentes representativos del aceite esencial de <i>Hyptis melissoides</i>	46
Tabla 4 Promedios de los halos de inhibición, tanto del grupo control como del experimental	50
Tabla 5 Concentraciones del aceite esencial de <i>Hyptis melissoides</i> y porcentaje inhibitorio de efecto inhibitorio que produjeron sobre <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	51
Tabla 6. Susceptibilidad de las bacterias con base en la zona de inhibición de acuerdo a los antibióticos sulfamethoxazole-Trimethoprim y Aztreonam	52

INTRODUCCIÓN

Colombia es uno de los países que cuentan con una mega biodiversidad en cuanto a flora y fauna, considerándose un lugar propio para llevar a cabo investigaciones que conlleven al estudio y reconocimiento de las especies existentes. Tal es el caso de las plantas aromáticas que han sido utilizadas tradicionalmente por sus componentes. Entre ellos, los aceites esenciales que posee la familia de las lamiáceas (Lamiaceae) del orden Lamiales también llamadas labiadas, son una familia que comprende 210 géneros y alrededor de 3.500 especies. Tradicionalmente esta familia era conocida por el nombre de Labiatae, pero siguiendo las recomendaciones del Código de Nomenclatura Botánica, su nombre ha sido substituido por Lamiaceae en alusión al género tipo de la familia: Lamium (Watson y Dallwitz, 1992).

Las labiadas están representadas en Colombia por 23 géneros y unos 203 taxones (entre especies y subespecies), de los cuales 186 son nativos y sólo una pequeña parte (17 especies) son plantas foráneas que en la actualidad se encuentran naturalizadas formando parte integrante de la flora colombiana (Fernández, 1998; Fernández *et al.*, 2003).

Estas plantas han sido utilizadas ya sea como medicina, condimento o, más raramente, como alimento y también han sido usadas en numerosos casos como plantas ornamentales, muy usadas por su aroma o por sus flores. Desafortunadamente, muchas de las Lamiceae se encuentran amenazadas debido a que presentan una distribución restringida a ciertos sectores de las cordilleras, además su población natural a menudo es bastante reducida, por lo que su estudio no sólo tiene gran relevancia a nivel de identificación de compuestos de interés industrial sino que además es de gran importancia en términos de conservación a nivel nacional.

A nivel mundial son muy usadas en la industria de perfumes, cosméticos, refrescos y medicinas, por la diversidad de aromas que se presentan en las diferentes especies (Fernández y Rivera, 2006). Ejemplo de esto es el género

Hyptis, reconocido en diferentes partes del mundo por sus propiedades antibacteriales y antioxidantes que están presentes en los aceites (Viña *et al.*, 2007). Desde hace muchos años se ha venido evaluando para buscar un efecto antibacteriano en diferentes organismos, entre ellos *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Shigella dysenteriae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Salmonella typhi*, *Sarcina lutea*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus pumilus*, *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus*, *Pseudomonas solanacearum*, demostrando ser un buen agente antibacterial (kar y Jain, 1971). Popularmente, las infusiones de la raíz y hojas de *H. suaveolens* y *H. albida* se usan en India, México y otros países para aliviar enfermedades estomacales, úlceras superficiales y conjuntivitis (Misra *et al.*, 1981; Pereda *et al.*, 1990; Barbosa y Barbosa, 1992; Menghini *et al.*, 1996). *H. capitata* en China se utiliza para, controlar fiebres, resfríos y problemas de asma (Lee *et al.*, 1988), en Ecuador es utilizada como fungicida y en Tailandia se utiliza para combatir la gripa, fiebres y asma (Almtorp *et al.*, 1991). *H. verticillata* y *H. pectinata* en México son usadas por su potencial antimicrobiano para aliviar fiebres, dolores de cabeza, rinofaringitis, para tratamientos gastrointestinales e infecciones de la piel (Pereda *et al.*, 1993), además se usa también con propósitos ornamentales (Rojas *et al.*, 1992; Khunt *et al.*, 1994).

H. spicigera es utilizada en África y Caribe para controlar fiebres y resfríos (Porter *et al.*, 1995), como antimicótico (Malan *et al.*, 1988) y también como alimento (Martinez, 1959; Vergara y Bravo, 1992). En el Norte de Nigeria el aceite es utilizado en el campo de la cosmetología (Onayade *et al.*, 1990). En varios países africanos las especies de *Hyptis* son utilizadas como controladoras de insectos (Aycard *et al.*, 1993) y en Brasil, el aceite es utilizado por contener monoterpenos, para combatir enfermedades como rinofaringitis, enfermedades de la piel, desordenes gástricos, infecciones bacterianas y cáncer (Bispo *et al.*, 2001; Melo *et al.*, 2005). Además se demostró que una cepa de *Escherichia coli* resistente a antibióticos aminoglucosidos, perdió su resistencia en presencia del extracto de *Hyptis martiusii*, el cual contiene flavonoides, sesquiterpenos y diterpenos (Henrique *et al.*, 2010). De esta manera podemos corroborar que el aceite que estas plantas poseen, se han usado desde la antigüedad como verdaderas concentraciones de las fuerzas vivificantes, calmantes y vigorizantes de la naturaleza.

Las propiedades medicinales de las plantas de la familia Lamiaceae se dan en virtud de los metabolitos secundarios que elaboran, entre los que se destacan los pertenecientes a los grupos de los aceites esenciales como: alcaloides,

cardenólidos, ciclitoles, cumarinas, esteroides, gomas, fenoles, flavonoides, glucósidos (cardiotónicos, cardenólidos, cianogenéticos), iridoides, lactonas, mucílagos, quinonas, resinas, saponinas, taninos y terpenos (mono, di, tri y/o sesquiterpenos) (Waizel y Martínez, 2007; Maguna *et al.*, 2006) Los monoterpenos como el linalool, extraídos de *Hyptis suaveolens*, son utilizados en medicina tradicional como sedantes y anticonvulsivos (Rojas *et al.*, 2010; Brum *et al.*, 2001). De otro lado, en el caso de los monoterpenos oxigenados responsables del olor en las plantas, son extraídos para utilizarlos como esencia aromática en productos de higiene tales como jabones, detergentes, champús, lociones, desodorantes y pastas de dientes (Rojas *et al.*, 2010; Reyes *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2004; Murillo *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2004). Este aspecto es de gran importancia para la industria colombiana de aromas y fragancias que han mostrado crecimientos anuales del 10% proyectado a nivel mundial, hecho que podría directa o indirectamente activar el desarrollo económico de regiones rurales a través de la comercialización de estos productos vegetales (Castañeda *et al.*, 2007).

Recientemente en Colombia se ha adelantando un trabajo de prospección usando labiadas nativas y en este sentido se han efectuado extracciones y caracterización de lectinas y mucílagos de más de 50 taxones, con muy buenos resultados. Estas lectinas tienen importancia clínica, ya que interactúan de modo específico con determinados antígenos (Fernández *et al.*, 2003; Pérez y Vega, 2007; Pérez *et al.*, 2006). Más recientemente, el grupo de investigación de proteínas de la Universidad Nacional de Colombia, viene trabajando de forma específica en el estudio de la actividad biológica de algunas lectinas encontradas en algunas especies de la Familia Lamiaceae tales como; *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*, en relación con la detección temprana de algunos tipos de células cancerígenas (Vega y Pérez, 2001; Vega *et al.*, 2001; Vega y Pérez, 2006). Esta proyección es muy importante para nuestro país, ya que la investigación y el estudio de nuestra biodiversidad es una plataforma para el desarrollo económico. La ventaja como país biodiverso prácticamente no ha repercutido como debería, entre otros planteamientos porque no se han realizado investigaciones de mercado que identifiquen las oportunidades de negocios concretas que permitan adelantar programas y proyectos productivos para el aprovechamiento sostenible y rentable.

Con base en lo anteriormente expuesto, este trabajo de investigación tuvo como objetivo aislar y purificar mediante técnicas moleculares y químicas el aceite de la planta *Hyptis melissoides*, con el fin de analizarlo y evaluarlo biológicamente frente a organismos patógenos tales como *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*

y por ende contribuir al conocimiento básico QUE PROPORCIONA al campo medico un uso alternativo de interés farmacéutico con bases científicas acerca de este recurso biológico con alto potencial.

En Colombia faltan estudios que permitan caracterizar la diversidad vegetal, e identificar compuestos químicos como los aceites esenciales (Aes) y la evaluación de éstos frente a microorganismos patógenos.

Por otra parte, es conocido que el estudio fitoquímico y farmacológico necesita personal altamente especializado y la incorporación de nuevas técnicas, lo que condiciona en forma decisiva la investigación. Para que en nuestros países se mantenga una alta calidad competitiva, se necesita la renovación constante de equipos e insumos, lo que supone inversiones elevadas, difíciles de lograr en países que dedican pocos recursos a la investigación. Esta es una causa fundamental para que se incremente la brecha que separa la investigación entre los países desarrollados y los de América Latina. Esta también es la causa, junto con la falta de políticas y estrategias nacionales y regionales en relación con la investigación de productos medicinales de origen vegetal, por ejemplo en el **tropico amazónico se haya transformado en una tierra de nadie**, donde pueden llegar cuando quieran investigadores y colectores extranjeros para llevarse los conocimientos etnomédicos y las muestras de productos vegetales promisorios, sin dejar siquiera una copia de sus trabajos en el país, ni solicitar su permiso.

Frente a la desprotección en la que viven habitualmente los investigadores latinoamericanos, a la falta de oportunidades, muchos han sido contratados por proyectos extranjeros convirtiéndose en simples colectores y exportadores de muestras botánicas o de informes etnomédicos. Esto es más lamentable aún, cuando se lesiona, como habitualmente sucede, la ética de las relaciones entre el investigador y los pueblos creadores y poseedores del saber tradicional, sin que se reconozcan sus derechos intelectuales y peor aún sin que se piense siquiera en una coparticipación de beneficios por la posible fabricación de una nueva droga de origen vegetal.

Por todas estas consideraciones podemos afirmar que en general la investigación química y farmacológica de las plantas tiene resultados muy pobres en toda

América Latina *Hyptis melissoides*, es una planta que se encuentra en escasas localidades del sur de Colombia (Huila, Cauca y Nariño) y Ecuador (estado de Azuay), entre los 900 y 2.000m (Fernández y Rivera, 2006). Es una planta con gran potencial de acuerdo al conocimiento popular y a las prácticas que con ella se realizan para curar enfermedades causadas por diversos microorganismos, pero desafortunadamente hasta el momento no se han reportado estudios sobre su descripción botánica, distribución, ecología ni sobre el origen de sus propiedades.

pertenecer a la familia Lamiaceae tiene un futuro promisorio en el campo de la medicina herbal y farmacéutica tanto en el mercado nacional como internacional, ya que como se ha demostrado en varios estudios sobre diferentes géneros de esta familia, incluyendo *Hyptis*, éstas tienen características antimicrobianas, antifúngicas y terapéuticas. También es importante anotar que según, registros etnobotánicos reportados por la Universidad Nacional de Colombia, es una especie que se encuentra en amenaza de extinción por encontrarse en territorios muy poblados y modificados por el hombre en tiempos recientes, principalmente en las franjas subandina, andina y la franja cafetera, debido a establecimiento de cultivos, ganadería y ampliación de zonas urbanas (Fernández y Rivera, 2006).

Con base en la problemática mencionada, la propuesta plantea las siguientes preguntas de investigación.

- ¿Cuáles compuestos químicos tiene el aceite esencial de *Hyptis melissoides*?
- ¿El aceite de *Hyptis melissoides* tiene efecto antibacterial?

Hipótesis

- El aceite esencial de *Hyptis melissoides* tiene actividad antimicrobiana.

1. MARCO TEORICO

La diversidad de labiadas en Colombia puede considerarse equivalente a la registrada en Perú, con 20 géneros y 190 especies o en Ecuador con 21 géneros y 135 especies (Brako y Zarucchi, 1993; Jorgensen y León, 1999). Los géneros más diversos en Colombia son *Salvia* con 83 taxones e *Hyptis* con 42, ambos son, a su vez, los más diversos de la familia en territorio Americano. Hay además, otras 21 especies de labiadas exóticas, ampliamente cultivadas en Colombia por sus diferentes usos (Brako y Zarucchi, 1993; Jorgensen y León, 1999).

1.1 *Hyptis melissoides*

1.1.1 Ubicación Taxonómica. *Hyptis melissoides*. (*Mastranto de Juanambú*), es un arbusto que pertenece a La Familia Lamiaceae. El nombre vulgar hace referencia a la localidad típica de la especie, el cañón del Juanambú, lugar donde la planta fue recolectada por los naturalistas Alexander von Humboldt y Aimé Bonpland a principios del siglo diecinueve, como consta en la descripción original de esta especie (Kunth, 1818).

Taxonómicamente se ubica en la Familia: Lamiaceae, Subfamilia: Nepetoideae, Tribu: Ocimeae, Género: *Hyptis*, Especie: *Hyptis melissoides* Kunth (1891).

1.1.2 Características morfológicas. Es un arbusto aromático de 1 a 3 metros de altura, muy ramificado, con ejes basales engrosados y entrenudos cortos (1 a 3 cm); ramas cuadrangulares, pubescentes, hojas simples, opuestas, ovadas, pubescentes, miden de 2,7 a 6,5 cm de largo y 2,5 a 4,5 cm de ancho; ápice agudo y base redondeada, truncada a subcordada; margen crenado-aserrado; haz verde; envés verde grisáceo; venación pinnada con nervios secundarios 4-6 por lado, ascendentes, hundidos por el haz, prominentes por el envés; pecíolos pubescentes de 0,7-1,6 de largo, sulcados adaxialmente, Inflorescencias axilares, dos por axila, cimoso-paniculadas y tienen una forma muy característica, ya que son abiertas y presentan al menos tres grados de ramificación, carácter que permite separar a esta especie con facilidad de otras especies cercanas que invariablemente presentan inflorescencias axilares paniculadas, más compactas, en grupos de 2. Las flores son pequeñas de 5-7 mm de largo, pedunculadas; cáliz gamosépalo, con 4-5 piezas parcialmente soldadas y que forman dos labios, el superior frecuentemente recto en forma de casco (gálea) y que da protección a los estambres y el inferior trilobado y más extendido, sirve como plataforma a los insectos para el proceso de polinización; corola gamopétala, con 5 pétalos, bilabiado-bilobulada, de color blanco; estigma de color blanco; estambres 4, filamentos blancos, anteras caféas. Semillas diminutas, redondas.



Figura 1. Fotografía A: arbusto, B. flor con anteras, de *Hyptis melissoides*

1.1.3 Distribución Geográfica. *Hyptis melissoides* es conocida en escasas localidades del sur de Colombia (Huila, Cauca y Nariño) y Ecuador (estado de Azuay), entre los 900 y 2.000 m. (Fernández y Rivera, 2006).

1.1.4 Material Representativo. CAUCA: existen registros de esta especie en Mercaderes, 1100 m, octubre 1946, por *Haught 5147* (COL).

HUILA: se encontró esta especie en febrero de 1992, por *Llanos 2045* (SURCO).

NARIÑO: existen registros en carretera panamericana, a 1 km del túnel de Peñalisa, en junio de 1976, por *Benavides 431* (COL); también en el Municipio del Tambo, a 1500 m, en abril de 1987, por *Benavides 7845* (COL, PSO); de igual manera se encontró en la carretera Pasto-Cali, en diciembre de 1962, por *Saravia 1992* (COL); también en la provincia de Pasto, boquerón del paso del Juanambú, 1300 m, junio de 1853, por *Triana 8583* (COL, US).

1.1.5 Situación Actual. Las poblaciones colombianas de esta especie se consideran vulnerables, porque se conocen de cinco localidades que demarcan una extensión de presencia cercana a los 800 km². Todas las localidades enfrentan problemas de deterioro del hábitat. La única localidad Colombiana ubicada fuera de la cuenca del río Patía (en el desierto de La Tatacoa, Huila) es de registro más reciente y se tiene muy poca información sobre su estado de conservación.

1.2 ACEITES ESENCIALES.

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas que son importantes en la industria cosmética (perfumes, aromatizantes), de alimentos (condimentos, saborizantes) y Farmacéutica (saborizantes) (Martínez, 2003). Siendo mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser: Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), Monoterpenos, Sesquiterpenos y Fenilpropanos (Martínez, 2003).

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias

responsables del aroma de las plantas que son importantes en la industria cosmética (perfumes, aromatizantes), de alimentos (condimentos, saborizantes) y Farmacéutica (saborizantes) (Martínez, 2003). Siendo mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser: Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), Monoterpenos, Sesquiterpenos y Fenilpropanos (Martínez, 2003).

1.2.1 Clasificación. Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios: De acuerdo con su consistencia como esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las Esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los Bálsamos son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización. Las Oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (caucho, gutapercha, chicle, balata, oleorresina de paprika, de pimienta negra, de clavel, etc.) (Martínez, 2003).

De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosos. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín enriquecidas con linalool, o la esencia de anís enriquecida con anetol. Los aceites esenciales sintéticos, son producidos por la combinación de sus componentes, mediante proceso de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa, etc.) (Martínez, 2003).

Desde el punto de vista químico, los aceites esenciales se pueden clasificar según como estén constituidos. Los aceites esenciales ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales monoterpenoides (p.ej. hierbabuena, albahaca, salvia, etc.). Los ricos en sesquiterpenos son los aceites esenciales sesquiterpenoides (p.ej. copaiba, pino, junípero, etc.). Los ricos en fenilpropanos son los aceites esenciales fenilpropanoides (p.ej. clavo, canela, anís, etc) (Martínez, 2003).

1.2.3 Aceites Esenciales de *Hyptis*. El incremento del número de reconocimiento del genero *Hyptis*, ha tomado gran importancia en el campo farmacéutico, clínico puesto que tiene componentes muy importantes como son los aceites esenciales, que están formados por compuestos químicos, tales como: alcaloides, cardenólidos, ciclitoles, cumarinas, esteroides, gomas, fenoles, flavonoides, glucósidos (cardiotónicos, cardenólidos, cianogenéticos), iridoides, lactonas, mucílagos, quinonas, resinas, saponinas, taninos y terpenos (mono, di, tri y/o sesquiterpenos), estos terpenos están clasificados en tres categorías, los que contienen grupos alcoholes, los que poseen aldehídos y por último los que tienen grupos cetónicos, teniendo propiedades antibacteriales y antioxidantes (Waizel y Martínez, 2007; Maguna *et al.*, 2006; Viña *et al.*, 2007). En *Hyptis* se ha encontrado dos clases de aceites, Los aceites monoterpenoides, sesquiterpenoides (Martínez, 2003)

1.3 CROMATOGRAFÍA DE GASES-MASAS.

La cromatografía de gases y su acoplamiento con la técnica de espectrometría de masas se ha constituido en una herramienta potente para separar, identificar y cuantificar los componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas. A través de la espectrometría de masas se puede identificar sustancias puras pero no se pueden identificar los componentes individuales sin antes separar previamente sus elementos debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente. Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, GC (“Gas Chromatography”) y MS (“Mass Spectrometry”) da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas (Gutiérrez, 2002).

La utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles. El único obstáculo serio a la hora de realizar su acoplamiento es que el efluente que emerge de la columna cromatografía sale a presión atmosférica y debe introducirse en el interior del espectrómetro de masas que trabaja a alto vacío. Actualmente, el acoplamiento directo resulta fácil cuando se utiliza la cromatografía de gases capilar, que es el caso más habitual (Gutiérrez, 2002).

En resumen, una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas (Gutiérrez, 2002).

En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma o "TIC" (total ion current). En efecto, la corriente iónica generada por todos los iones da lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado (Gutiérrez, 2002).

En el caso de mezclas complejas, el cromatograma obtenido puede presentar muchos picos, algunos de ellos muy próximos, resultando difícil la identificación rápida y fiable de algún compuesto de interés. Cuando se desea explícitamente localizar la presencia de uno o varios compuestos determinados, de espectro conocido, con la mayor rapidez o con la máxima sensibilidad posible se recurre a la técnica de detección SIR ("selected ion recording"). En esta modalidad de trabajo se detectan solamente algunas masas de interés, en lugar de trabajar con el total de los iones (TIC). De esta forma, se aumenta la selectividad del método reduciéndose las interferencias (Gutiérrez, 2002).

1.4 BACTERIAS.

1.4.1 Morfología. Cápsula bacterina: Es una estructura que aparece en algunas bacterias, está compuesta de polisacáridos, polialcoholes, aminoazúcares. Cumpliendo las siguientes funciones: Resistencia a la desecación al ataque de células fagocíticas y anticuerpos del sistema inmune y fijación a células hospedadoras.

Pared Celular. Es una envoltura rígida que rodea la membrana plasmática, da forma a la bacteria y soporta fuertes presiones osmóticas. Según la composición de la pared hay, dos tipos bacterias Gram Positivas y Gram Negativas. En ambos casos tienen una capa de mureína, su parte glúcida está formada por N. Acetilmuránico y N. Acetilglucosamina. En las Gram Positivas se une cuatro ácidos (L-alanina, D-alanina, D-ácido glutámico, L-lisina). En las Gram Negativas (Figura 3) se caracteriza porque los peptidoglicanos aparecen una capa de lipolisacáridos y proteínas, esta capa se denomina membrana externa; da un aspecto bibliestratificado y confiere mayor resistencia a los antibióticos. Las Gram Positivas (Figura 2) carecen de esta membrana externa por lo que tiene un aspecto monoestratificado. Sobre los peptidoglicanos aparecen una capa con ácido teicoicos. En ocasiones las bacterias no tienen pared celular, denominándose protoplastos (Brook, 2005)

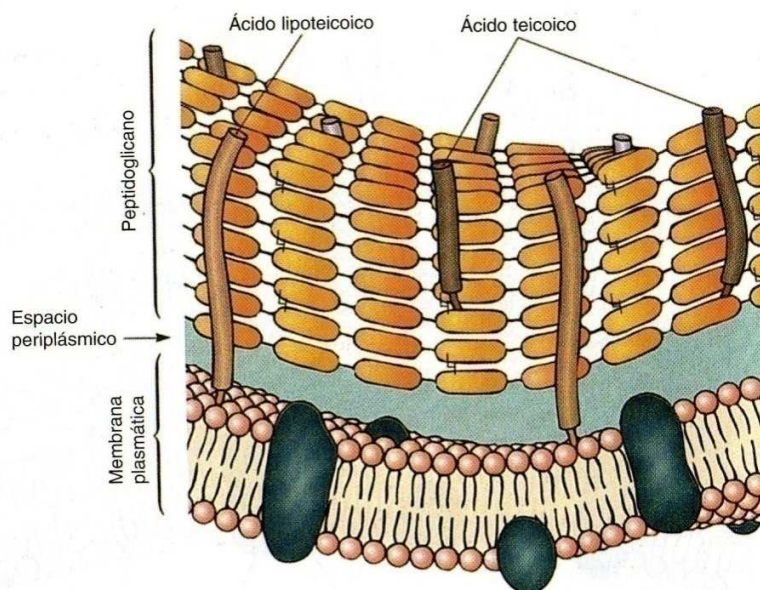


Figura 2. Pared en Bacterias Gram positivas

Fuente: Prescott, Harley y Klein, 2002

Las bacterias Gram positivas son células que están constituidas por una pared celular, conformada por ácidos teicoicos, son polialcoholes unidos por ésteres de fosfato (polímeros que contienen glicerolfosfato o residuos de fosfato de ribitol). Éstos aportan carga negativa a la superficie celular lo que puede servir para el transporte de iones a través de la pared. También algunos ácidos teicoicos (que contienen glicerol) se unen a los lípidos de la membrana (ácidos lipoteicoicos). Debido a ello estas células son muy sensibles a la acción de la lisozima y penicilina (antibiótico utilizado para infecciones causadas por Gram positivas). La penicilina es un análogo estructural de la D-alanil-D-alanina, por tanto inhibe la formación de los puentes de entrecruzamiento del peptidoglicano inhibiendo así la formación de la pared celular (Brook, 2005).

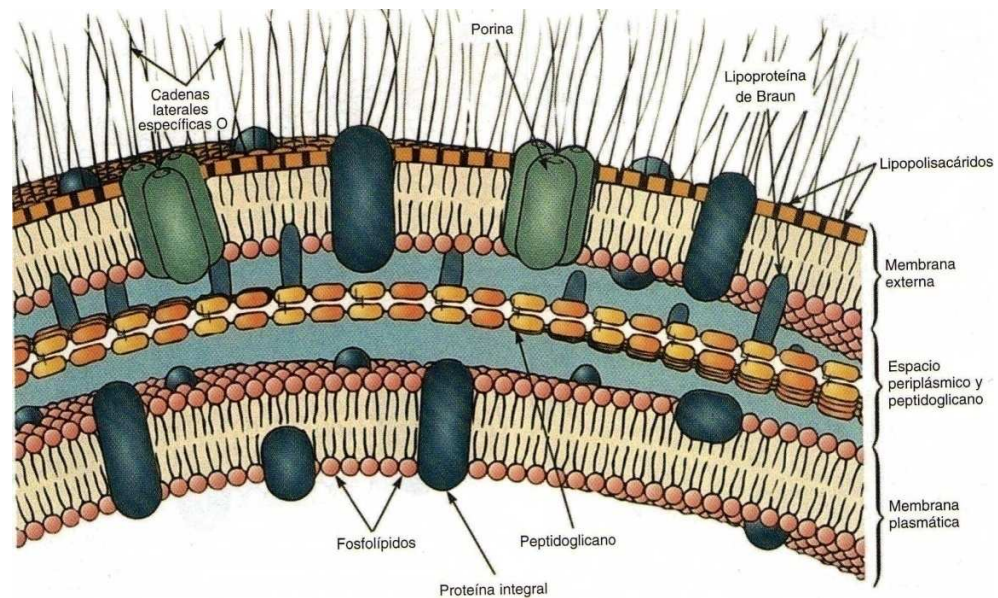


Figura 3. Pared Bacterias Gram negativas

Fuente: Prescott, Harley y Klein, 2002

En las células Gram negativas el peptidoglicano constituye sólo alrededor del 10% de la pared. Hacia fuera de la membrana citoplasmática hay un área abierta llamada periplasma, por fuera de esta hay una fina capa de peptidoglicano y externamente a éste está la membrana adicional, la membrana externa.

El peptidoglicano en células gram negativas está conectado entre unidades peptídicas pero sin puentes de pentaglicina como en Gram positivas. Al peptidoglicano se enlazan covalentemente lipoproteínas que también se unen a la membrana externa, de manera que el peptidoglicano tiene un fuerte enlace con la membrana externa.

La membrana externa ha sido extensivamente estudiada debido a su importante rol en la virulencia (facilidad de causar enfermedad). La membrana externa es una bicapa lipídica similar a la membrana celular, contiene lípidos y proteínas pero también lipopolisacáridos (LPS) ubicados hacia la cara externa, lo que diferencia ambas caras de la membrana. Estos lipopolisacáridos. LOS LPS le confieren carga negativa y repelen moléculas hidrofóbicas, pueden actuar como antígenos en el reconocimiento de ciertos bacteriófagos (virus que infectan bacterias). Los LPS son muy importantes para el hombre, dado que cuando están libres en solución son tóxicos y se llaman endotoxinas (inducen a fiebre, cambian el número de glóbulos blancos, interfieren en la coagulación hasta producir la muerte) (Brook, 2005).

Staphylococcus aureus: anaerobio facultativo de la familia *Staphylococcaceae*, coco, Gram positivo, sus células se disponen en racimos. Suele constituir parte de la microflora normal humana y puede ocasionar infecciones oportunistas debido a la producción de enzimas que contribuyen a su virulencia y propagación; es considerado el principal patógeno en el hombre, causante de infecciones en la piel y tejidos blandos, neumonía y septicemia (Brook *et al.*, 2005). Han emergido cepas resistentes a metilina y otros agentes antibacterianos llegando a ser una preocupación en el ambiente hospitalario debido a las infecciones sistémicas que ocasiona (Mamani *et al.*, 2006). En agar nutriente generalmente forma colonias de color gris o amarillo dorado (Presscott *et al.*, 2005; Callejas, 2009).

Klebsiella pneumoniae: anaeróbico facultativo de la familia *Enterobacteriaceae* bacilo Gram negativo. Esta bacteria se caracteriza por ser generalmente capsulada, no móvil, productora de la enzima lisina descarboxilasa pero no de la enzima ornitina descarboxilasa, y normalmente positivas a la prueba de Voges-Proskauer (Rashid y Ebringer, 2006); Probablemente tiene dos hábitats comunes: el medio ambiente, en el cual se halla en aguas superficiales y residuales, en el suelo y sobre las plantas; y las superficies mucosas de mamíferos. En humanos portadores *K. pneumoniae* se encuentra en las vías respiratorias superiores y en el tracto intestinal (Rashid y Ebringer, 2006); infectan principalmente a individuos

inmunocomprometidos que se hallan hospitalizados y padecen severas enfermedades subyacentes, como pueden ser la diabetes mellitus o la obstrucción pulmonar crónica. Presenta sensibilidad intrínseca a las cefalosporinas de espectro extendido y a las cefamicinas, dado que no contiene la beta lactamasa cromosómica del tipo Ampc (Rashid y Ebringer, 2006).

1.5. TÉCNICAS PARA EVALUAR ACTIVIDAD BIOLÓGICA USANDO MICROORGANISMOS.

1.5.1 Métodos de antibiograma basados en difusión. Técnica de difusión en agar (*método de Kirby-Bauer*). Esta técnica se basa en los lineamientos dados por la NCCLS. Se utiliza un inóculo bacteriano que incluye un número conocido de bacterias para sembrar en un medio de cultivo (placa de Petri). Posteriormente, se depositan unos discos de papel impregnados con una concentración determinada de antibiótico. Después, la placa es incubada durante unas 24 horas para permitir el crecimiento bacteriano confluyente. Alrededor del disco donde se difundió el antibiótico, la bacteria no crecerá (zona de no crecimiento), denominándose esta zona "halo de inhibición". A continuación se mide el diámetro y se compara las medidas estándar dadas para ese antibiótico. El tamaño del halo de inhibición permite determinar si el aislado clínico es sensible o resistente a un antibiótico. Este mismo sistema se usa para evaluar el efecto de cualquier sustancia sobre bacterias u hongos.

1.5.2 Métodos de antibiograma basados en dilución. Son los métodos clásicos de antibiograma. En términos generales consisten en preparar varios tubos de medio de cultivo con diferentes concentraciones del antibiótico o sustancia a evaluar, e inocularlos con la cepa microbiana que se estudia. Pueden utilizarse medios líquidos o sólidos. La CMI corresponde con el tubo de concentración más baja que logre inhibir el 90% del crecimiento bacteriano. En función del soporte donde se realizan los sistemas de dilución se consideran métodos de macrodilución con tubos independientes y métodos de microdilución que usan placas integradas con múltiples pocillos en cada uno de los cuales se coloca una concentración diferente de antibiótico. Los sistemas automatizados de antibiograma se basan en métodos de microdilución. Los métodos de dilución son en muchos casos los de referencia por su mayor exactitud y por su carácter cuantitativo, ya que la lectura se realiza por turbidez (CMI).

2. ANTECEDENTES

La extracción del aceite esencial de *Hyptis* se remonta a varios años atrás. Puesto que estos compuestos han demostrado ser unos buenos candidatos para ser utilizados en diferentes aplicaciones tanto en el campo médico (Lu *et al.*, 2007; Mbwambo *et al.*, 2001; Rojas *et al.*, 2010; Reyes *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2004; Murillo *et al.*, 2004; Martín *et al.*, 2004); como en la agricultura (Henrique *et al.*, 2010).

2.1 COMPOSICIÓN.

En diferentes especies del género *Hyptis* se ha reportado la presencia de compuestos tales como fenoles, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides. A estos antioxidantes naturales, especialmente los flavonoides, flavonoles, catequinas, antocianinas y poliflavonoides, se reporta como responsables de efectos biológicos como antibacterial, antiviral, antiinflamatorio y vasodilatador (Cook y Samman, 1996). Esta actividad biológica de la que se habla puede variar desde la inhibición completa o parcial del crecimiento microbiano hasta la acción bactericida o fungicida.

Tabla 1. Componentes de Aceites Esenciales de diferentes *Hyptis*

Especie	Componentes de aceites esenciales de diferentes <i>Hyptis</i>
<i>H. mutabilis</i>	♣ Monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos, sesquiterpenos oxigenados, fenoles, hidrocarburos. Demostrado actividad farmacológica, de igual manera como compuesto principales en la industria cosmetología (Castañeda <i>et al.</i> , 2007)
<i>H. suaveolens</i>	♣ Triterpenos (Ácido ursólico, ácido betulínico, ácido 3β-hidroxilup-12-en-27-óico, Ácido urs-12-en-3β-ol-29-óico, Ácido 3β-hidroxilup-12-en-28-óico, Ácido hyptadiênico, Ácido suaveólico y ácido suaveolol, Ácido oleanólico, Friedelina, lupeol, Acetato de lupeol, α-amirina, β-amirina). Monoterpenos (Canfeno, Mentol, β-felandreno,) Acetato de citronelila, óxido de piperitona, acetato de geranila, Limoneno, Terpinoleno, l-sabineno, D-limoneno e Ácido sabeneico, α-terpineno).

	<p>Sesquiterpenos (α-humuleno, β-cariofileno, Óxido de cariofileno, Biciclogermacreno, Germacreno D, α-cariofileno, Germacreno B, β-bourboneno, α-bulneseno, d-cadineno, g-cadineno), Demostrando efecto antibacterial. Contra <i>Salmonella typhi</i>, <i>Proteus vulgaris</i>, <i>S. albus</i> e <i>S. hemolyticus</i> (Rao y Adinarayana, 1970).</p> <p>De igual manera tiene efecto antibacterial, con bacterias del tracto digestivo</p> <ul style="list-style-type: none"> ♣El extracto bencénico de la raíz inhibió el crecimiento de champiñones <i>Helminthosporium orizae</i>. (Misra <i>et al.</i>, 1981). ♣El extracto metanolico, fue evaluado en bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y antifúngicas contra <i>Candida albicans</i>, mostrando buenos resultados. (Rojas <i>et al.</i>, 1992). ♣El aceite, presento efecto antibacterial. Contra <i>Salmonella typhi</i>, <i>Proteus vulgaris</i>, <i>Staphylococcus albus</i> y <i>S. haemolyticus</i>. (Rao y Adinarayana, 1970). ♣Este aceite fue suministrado a pacientes como enjuague. (Jain <i>et al.</i>, 1974), también inhibo el crecimiento, contra. <i>Corynebacterium</i>, <i>Diphtheriae</i> y <i>Pseudomonas solanacearum</i> (Kar y Jain, 1971), este aceite es considerado como el mas potente dentro del campo agrícola.
<i>H. capitata</i>	<ul style="list-style-type: none"> ♣Triterpenos, (Ácido oleanólico, Ácido pomólico, Ácido ursólico, Ácido betulínico, ácido oleanólico 3-O-(3', 3'-dimetil) succinato, Ácido 2a-hidroxiursólico, ácido tormentico, ácido maslínico, ácido Hyptático, ácido hyptático B,). Sesquiterpenos (β-cariofileno), y otros compuestos químicos como el fenol, Flavonóides (Falcão, 2003). ♣El acido ursólico presento Citotoxicidad en células de leucemia linfocítica, P-388 y L-1210, de igual manera en las células humanas de carcinoma pulmonar L-549. También tuvo cierta actividad en las células KB, HCT-8 (el colon humano) y tumor mamario (MCF-7) (Lee <i>et al.</i>, 1988) ♣Acido hyptático y acido 2-a-hidroxiursólico, demostraron citocixicidad <i>in vitro</i> en células HCT-8 de tumor de colon (Yamagishi <i>et al.</i>, 1988).
<i>H. verticillata</i>	<ul style="list-style-type: none"> ♣Triterpenos, Monoterpenos, siendo compuestos de importancia farmacéutica (Falcão, 2003). ♣El aceite mostro tener. 5-metoxidesidropodofilotoxina+desidro-β peltatinametiléter+desidropodofilotoxina+desoxidesidropodofil

	<p>otoxina: presentan actividad en células cancerígenas de mama, colón, pulmón, próstata, fibrosarcoma, KB y KBIV (Novelo <i>et al.</i>, 1993).</p> <p>♠El aceite + ácido rosmarínico +desidropodofilotoxina + (R)-5-hidroxi pirrolidina –2-ona, contribuyen al efecto antibiótico frente ha <i>B. subtilis</i> (Khunt <i>et al.</i>, 1995)</p>
<i>H. emoryi</i>	<p>♠El aceite presento tener compuestos como: Triterpenos, Monoterpenos, Sesquiterpenos y acetato de decila. Siendo utilizados en los campos farmacéuticos y cosmetodologicos. (Falcão, 2003).De igual manera estos compustos tienen propiedades, carcinogénicas, anti fertilidad, micotóxicas y fitotóxica (Tanowitz <i>et al.</i>, 1984)</p>
<i>H. pectinata</i>	<p>♠ Monoterpenos, Sesquiterpenos., que se encontró en el aceite, (Falcão, 2003). Demostraron tener propiedades antisépticas (Pereda-Miranda <i>et al.</i>, 1993).</p> <p>♠Pectinolídeo, este compuesto fue evaluado frente ha <i>S. aureus e B. subtilis</i> (con una concentración entre 6,25 e 12,5 µg/mL) mostrando efectos antibacterianos (Pereda <i>et al.</i>, 1993).</p> <p>♠pectinolídeos A, B, C, presentando efectos antibacterianos, ya que fue evaluado en bacterias Gram-positivas y presento efectos sitotoxicos (de 50<4 µg/mL)y también se evaluó frente a células cancerígenas (Pereda <i>et al.</i>, 1993)</p>
<i>H. spicigera</i>	<p>♠El Spicigerolido, que se encontró en el aceite, mostro efectos cito tóxicos frente a células KB; (Pereda <i>et al.</i>, 2001).</p> <p>♠El Diterpeno, que se encontró, mostro actividad fúngica, frente crecimiento de larvas de <i>European cornborer</i>. (Fragoso <i>et al.</i>, 1999).</p>
<i>H.romboides</i>	<p>♠El acido 2α, 3α 24–trihidroxido que contiene, presento citotoxicidad <i>in vitro</i> frente a células hepáticas pulmonares (HS-G2) (Lin <i>et al.</i>, 1993).</p>

2.2.1 Actividad farmacológica de *Hyptis*. Algunos estudios reportan que la actividad antimicrobiana presentada por los aceites esenciales de *Hyptis* es debida en gran medida a la presencia de terpenoides y monoterpenoides (Panuwat *et al.*, 2003; Sikkema *et al.*, 1995; Helander *et al.*, 1998).

En estudios realizados con *hyptis suaveolens*, se encontró el linalol, perteneciente a los aceites monoterpenoides, fueron evaluados en medicina tradicional como sedantes y anticonvulsivos, mostrando un rendimiento del 80% de efectividad (Rojas *et al.*, 2010; Brum *et al.*, 2001).

Otra especie que mostro importancia farmacéutica es *H. spicigera*, en esta especie se encontró un componente químico muy importante como lo es Spicigerolido, que mostro efectos cito tóxicos frente a células KB; (Pereda *et al.*, 2001), de igual manera se encontró otro compuesto químico como: Diterpeno que mostro actividad fúngica, frente crecimiento de larvas de *European cornborer*. (Fragoso *et al.*, 1999). De igual manera otra especie importante es, *H. pectinata*, ya que se encontró un componente químico relevante como: Pectinolídeo, este compuesto fue evaluado frente ha *S. aureus* y *B. subtilis* (con una concentración entre 6,25 e 12,5 µg/ml) mostrando efectos antibacterianos (Pereda *et al.*, 1993), también se encontró pectinolídeos A, B, C, presentando efectos antibacterianos, ya que fue evaluado en bacterias Gram-positivas y presento efectos citotoxicos (de 50<4 µg/ml) y también se evaluó frente a células cancerígenas (Pereda *et al.*, 1993), En otras investigaciones la especie *H. emoryi* mostro compuestos químicos, como triterpenos, Monoterpenos, Sesquiterpenos y acetato de decila. Que demostraron tener propiedades, carcinogénicas, anti fertilidad, micotóxicas y fitotóxica (Tanowitz *et al.*, 1984).

Otra especie de importancia farmacéutica, que ha contribuido en el campo medico es *H. capitata*, el extracto de toda la planta, inhibe la replicación de HIV-1 en células H9 con infección aguda, la dosis que suministrada fue de CE50=1,7 µg/ml, también inhibió el crecimiento de células H9, la dosis que se suministro fue CI50=21,8 µg/ml (IT=12,8) (Kashiwada *et al.*, 1998), el acido ursólico presento citotoxicidad en células de leucemia linfocítica, P-388 y L-1210, de igual manera en las células humanas de carcinoma pulmonar L-549. También tuvo cierta actividad en las células KB, HCT-8 (el colon humano) y tumor mamario (MCF-7), (Lee *et al.*, 1988), acido hyptático y acido 2-a-hidroxiursólico, demostraron citocixicidad *in vitro* en células HCT-8 de tumor de colón (Yamagishi *et al.*, 1988). En otras investigaciones que se ha llevado acabo reportan que, *H. rhomboides*, el acido 2α,

3 α , 24-trihidroxi que contiene esta especie, presenta citotoxicidad *in vitro* frente a células hepáticas pulmonares (HS-G2), (Lin *et al.*, 1993).

En otros estudios se encontraron que el aceite de *Hyptis martiusii*, tiene actividad antibacteriana, por tener; flavonoides, diterpenos, sesquiterpenos, donde mostraron tener actividad biológica frente a *Escherichia coli* (Isobe *et al.*, 2006; Fragoso *et al.*, 2005; Falcão, 2003); el microorganismo usado para la evaluación biológica de esta investigación, fue un aislamiento clínico provisto por la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de Tucumán. Las pruebas se realizaron por triplicado con un grupo control (alcohol al 96 %). Para la interpretación de los resultados se consideraron 3 categorías: inhibición del crecimiento, a todo halo translúcido detectado alrededor del disco, es decir que la bacteria es sensible al compuesto. No inhibición del crecimiento, no se forma halo por lo tanto la bacteria no es sensible. Inhibición del crecimiento en forma irregular, se observa una inhibición pero el halo no adopta la forma esperada (Isobe *et al.*, 2006; Fragoso *et al.*, 2005; Falcão, 2003). Mostrando resultados satisfactorios, puesto que los halos de inhibición se mostraron traslúcidos, lo que quería decir que el aceite estaba inhibiendo la bacteria (Isobe *et al.*, 2006; Fragoso *et al.*, 2005; Falcão, 2003).

Otra especie importante es *H. salzmanii*, el aceite de esta planta: presenta efecto antibacteriano contra *S. aureus*, *B. subtilis* y *Mycobacterium. smegmatis* (Messana *et al.*, 1990). Tras realizar la lectura de medición de halos se confirmó que el compuesto evaluado si respondía satisfactoriamente, puesto que los halos eran traslúcidos. Las pruebas se realizaron por triplicado y con un grupo control (alcohol al 96%) y posteriormente fueron analizados con el paquete estadístico SPSS, mostrando una significancia ($0,000 < 0.05$); (Messana *et al.*, 1990; Simões *et al.*, 2008; Sofos *et al.*, 1998).

Por otro lado hay estudios registrados que se han encontrado compuestos con alto índice de efectividad en microorganismos, pertenecientes al grupo de los terpenos, es el caso del aceite esencial del palmarosa (*martinii Cymbopogon*); en este aceite se encontró 65% de geraniol, el efecto de este compuesto causó la fuga K⁺ (potasio) Mg²⁺ (magnesio), en *Saccharomyces cerevisiae* (levadura), al ocasionar esta reacción, se bloqueó el canal de K⁺ (potasio), con cesio, pero seguía permaneciendo la fuga de este compuesto lo que se asumió que el aceite seguía teniendo efecto; al haber fuga de potasio y magnesio hubo un cambio en la conformación de los ácidos grasos saturados e insaturados de la levadura lleva a suponer que hubo alteración en la permeabilidad de la membrana celular,

ocasionando cambios en los componentes del metabolismo de la membrana; estos resultados fueron comprobados puesto que los esterios de metilo (moléculas de los ácidos grasos), se encontraba dañadas ya que estas moléculas se convirtieron en esterios de metilo y al dañarse la composición de los ácidos grasos en la membrana de la levadura afecta la viabilidad aumentando el grado de saturación o instauración al haber estos cambios de la fluidez de los lípidos la membrana va a cambiar la homeostasis (equilibrio). Este efecto perturba el equilibrio osmótico de la célula a través de la pérdida de iones, lo que ocasiona la muerte de la levadura (Prashar *et al.*, 2003), también se reportó que los terpenos dañaron las mitocondrias y las vacuolas de la célula de la levadura, ocasionando la muerte bacteriana (Prashar *et al.*, 2003).

En otras investigaciones se han encontrados compuestos que tienen efectividad bacteriana: citral, eugenol, nerolidol y α -terpineol. Compuestos químicos con alto índice farmacéutico, perteneciente a los terpenos; la efectividad del citral, compuesto del resultado de una mezcla de dos aldehídos monoterpénicos isoméricos, geranial y neral, mostró tener efectividad frente a *Trichophyton mentagrophytes*, tras realizar la aplicación de una concentración de 0.05 μ l, la morfología de la membrana del hongo cambió su estructura quitando sin importar la concentración que se haya escogido para ser evaluada, se asume que la efectividad de los terpenos se debe a que la parte cíclica del terpeno ataca la integridad de la membrana un protón a la fuerza, expandiendo la membrana y de esta manera dañando la permeabilidad de ella, los terpenos pueden atacar la integridad de los ácidos de la membrana haciéndola polar ocasionando problemas mitocondriales, conllevando a tener bajos niveles de energía y por ende ocasionando la muerte del hongo (Park *et al.*, 2009).

De igual manera fue evaluado el citral, frente al hongo *Aspergillus flavus*, ocasionando diferentes reacciones en la membrana del hongo como: Interacción del grupo amino de la proteína de la membrana con el lípido de la membrana, cambios de conductividad eléctrica de la membrana, activación de los canales de sodio y potasio, decreción de proteínas, oxidación de los ácidos carboxilos promovió el gasto de piruvato, ocasionó la actividad del malato de dehidrogenasa y subcconato de dehidrogenasa decreció y esto se evidenció que se disminuye el metabolismo celular, también se encontró que hay daño de DNA nuclear aunque esto no es seguro pero lo que sí es seguro es que hay desorden metabólico y esto podría ocasionar la muerte celular (Man *et al.*, 2004).

En otros estudios se encontró que el citral fue evaluado frente a la bacteria *Escherichia coli*, ocasionando, perforación en la membrana citoplasmática, también hubo disminución de proteínas, alteración de la entrada de iones, lo que se asume la muerte celular, fue ocasionada por alteraciones que se presentaron en la membrana (Somolinos *et al.*, 2009).

En estudios se ha reportado que los terpenos de propoleo actúan satisfactoriamente sin depender la concentración que se suministre, pero si infiere en el compuesto que se este evaluando, en esta investigación se evaluó B-pinene, al ser adicionado este compuesto con una concentración de 50µl, se observo que hubo daños mitocondriales por lo que decrece la viabilidad de los organismos; como es el caso del transporte electrónico que aumentando la fluidez de la membrana, lo que permitió el aumento de potasio a nivel de mitocondria conllevando a una mala formación de organelas y esto posteriormente terminaría con la muerte celular (Popova *et al.*, 2009).

Sin embargo el mecanismo de acción específico de estos compuestos aún hoy no ha sido claramente caracterizado. Aunque actualmente se propone como posible sitio de acción la membrana celular donde los terpenoides y monoterpenoides surtirían efecto desencadenando una serie de procesos que podrían arribar a la muerte bacteriana (Shane *et al.*, 1979; Ilkka *et al.*, 1998; Popova *et al.*, 2009).

Es de mencionar también que en la actualidad la resistencia de los microorganismos a los fármacos existentes tiende a incrementarse, razón por la cual se mantiene el ímpetu en la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos para combatir las infecciones y superar los problemas de resistencia bacteriana y los efectos secundarios de algunos agentes disponibles actualmente (Afriditi *et al.*, 1996; National Committee for Clinical Laboratory Standards., 1997).

Europa y Norteamérica juegan un papel importante en el comercio, ya sea para exportación o importación de material vegetal, proporcionando una gran demanda en los productos naturales y de esta forma posibilidades de una participación en los grandes mercados, pues el actual reto como ciudadanos integrantes de un país en vía de desarrollo como Colombia (IAr.H, 2003; Toscano, 2006; Cifuentes *et al.*, 2010). Es fomentar, promover y apoyar el desarrollo sustentable, el comercio y la inversión en los recursos biológicos, de allí la importancia de visualizar plantas como éstas con valor biológico y medico, que representan un

recurso con alto potencial disponible y que puede ser producido, cultivado y aprovechado de forma rentable.

En la industria farmacéutica han adquirido solidez diferentes especies de *Hyptis* dado el ascenso en la comercialización de ingredientes naturales, todo esto ligado a la salud, de esta manera se puede afirmar que la forma mas factible de ingresar en el mercado con un producto como éste, es inicialmente conociendo sus propiedades y actividades que entre otras cosas no están patentadas y que pueden comercializarse libremente, sin embargo un interés particular que se debe apreciar que las medicinas producidas directamente del producto tendrán mucho más valor que la comercialización del extracto crudo (IAr.H, 2003; Toscano, 2006; Cifuentes *et al.*, 2010)

3. METODOLOGÍA

3.1 PROCEDENCIA DEL MATERIAL VEGETAL.

La especie *Hyptis melissoides*, se colectó en el antejardín del señor Bernardo Ramirez, en la Ciudad de Popayán, Departamento del Cauca (N: 02° 26'.39" W: 76°37'.17") seleccionando frutos, flores y hojas con apariencia sana. Las muestras se depositaron en bolsas negras. Cabe destacar que el lugar de procedencia de esta planta fue en la vereda la Ensellada, Departamento de Nariño, (N: 1° 13'.0" W: 77°22'.0").

Posteriormente el material colectado se llevo al Laboratorio de Biología Molecular de La Universitaria del Cauca **CELMOLEC** (Figura 3A), donde se peso el material, utilizando la Balanza triple brasso (TRIPLE BEAM 700/800 SERIES Ohaus), reportando un peso 2.328g de peso húmedo (Figura 3B), para ser secado a temperatura ambiente durante 8 días; (Figura 3c) pero si antes haberlo cortado manualmente de manera fina, después del lapso de este tiempo se volvió a pesar, reportando un peso 1.341.2g, (Figura 3D) dando un porcentaje de humedad de 986.8, luego de haber hecho este procedimiento se procedió a preparar la muestra triturándola en un mortero (Figura 3E), y se peso los 50g de material para mezclarlos en 500ml de agua destilada. Desde su recolección el material fue manipulado haciendo uso de las medidas de asepsia respectivas (Cifuentes *et al.*, 2010).



Figura 4. Fotografías de *Hyptis melissoides*: A. Planta mojada; B. Peso mojado; C. Planta seca; D. Peso seco; E. Planta triturada; F. Preparación del material.

3.1.1 Protocolo extracción de aceite esencial. Procedimiento que Se realizo de acuerdo a la metodología descrita por (Cerpa, 2007) que consiste en aislar el aceite esencial de *Hyptis melissoides* utilizando las técnicas de laboratorio destilación por arrastre con vapor y extracción continua utilizando como disolvente agua destilada.

En un Matraz redondo de 1000ml boca 24/40 se mezclo 50g de material previamente seco y molido en 500ml de agua destilada, se realizo el montaje correspondiente, en una canastilla de manta eléctrica y se llevo a temperatura de ebullición con el fin de generar el vapor que pasará al matraz, para extraer de esta manera el aceite esencial de *Hyptis melissoides*; el cual será inmediatamente arrastrado por el vapor de agua en un proceso de destilación (Figura 5). Se dejo por un lapso de 6h, posteriormente se retiro el destilado (hidrolato) que se recogio en un balón de 250ml.



Figura 5. Destilación por arrastre con vapor y extracción continua utilizando como disolvente agua destilada.

3.1.2 Preparación del material. Se llevó a cabo siguiendo los siguientes parámetros; en primera instancia el destilado se depositó en un frasco erlenmeyer (matraz), después fue tapado con papel aluminio, finalmente se guardó en un lugar frío, dejando reposar por un lapso de tiempo de 12h. Esto se hizo con el fin, de separar los dos componentes que se pretendía estudiar; el aceite y el hidrolato; quedando el aceite en la parte superior de erlenmeyer y en la parte inferior el hidrolato; El tiempo de reposo fue muy importante puesto que en este tiempo el aceite se oxidaba permitiendo así separarlo del hidrolato.

Para llevar a cabo este procedimiento se diseñó un protocolo acorde al objetivo que se pretendía, que era separar el aceite del hidrolato, se utilizó una pipeta pasteur para recoger el aceite, tras realizar este procedimiento, se purificó el material por medio de un equipo de filtración al vacío Supelco Visiprep (Figura 6), después el aceite de *Hyptis melissoides* se centrifugó 18.000 revoluciones por 5 minutos, con el fin de purificar el material de otros compuestos que pueda quedar a parte del agua, esto se hizo con el fin de que el material esté en óptimas condiciones para ser evaluado en la lectura de cromatografía de Gases-Masa, como para evaluar frente a las bacterias.

El material fue conservado en un frasco ámbar a temperatura de 4°C. Este protocolo se adoptó puesto que el aceite evaluado era muy denso y escaso, lo que no permitió aplicar el protocolo estipulado para la separación de aceites esenciales

descrito por (Cerpa, 2007), que consiste en colocar el aceite en un embudo de separación con el propósito de separar la mayor parte de la fracción acuosa. El aceite sobrenadante (unas cuantas gotas), se agrega 5ml de acetato de etilo para facilitar su separación. La fase acuosa se desecha y el extracto orgánico se colecta en un matraz, erlenmeyer o un vaso de precipitados y se agrega la cantidad necesaria de sulfato de sodio anhidro grado reactivo para eliminar el agua. Luego se filtra o en su defecto se decanta, con el fin de eliminar agua u otras sustancias que puedan quedar, para que finalmente el extracto quede totalmente seco. Se conserva en un frasco ámbar a temperatura de 4°C y el hidrolato se siguió otro protocolo que consistió en fitrarlo mediante un filtro SWINNEX (Figura 7), esto se hizo bajo cámara de flujo laminar marca Sony Cybershot DSC-w80 . Con el fin de purificar la muestra y poder eliminar cualquier contaminación, para posteriormente ser evaluado frente a las cepas *Klebsiella pneumoniae* ATCC10033 y *Staphylococcus aureus* ATCC25923.



Figura 6. Purificación del material por filtración al vacío



Figura 7. Filtración de Hidrolato por SWINNEX

La composición química del aceite esencial y la abundancia relativa de los principales componentes se identificó mediante un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS) marca Shimadzu QP-2010, equipado con un inyector automático AOC-20i+s, automuestreador con inyección AOC-20s Split/splitless, modo de ionización EI/PCI/NCI y sistema de inserción directa controlado por software de solución GC-MS. Con columna Rtx-5sil-ms Pesticides Restek de 30 m de largo, 0.25 mm DI, 0.25 μm de partícula y el gas de arrastre helio. Se empleara un programa de temperatura en el equipo, iniciándose el proceso a 50°C durante un minuto, luego se incrementara la temperatura a razón de 2°C/min hasta 280°C y seguidamente hasta 300°C a razón de 10°C/min. El inyector se mantendrá a 280°C para la identificación de los componentes del aceite (Cifuentes *et al.*, 2010). Este procedimiento se realizó en laboratorio calidad de productos naturales de La Universidad Tecnológica de Pereira (U.T.P).

3.1.3 Evaluación de la actividad biológica del aceite esencial en bacterias.

Los microorganismos usados para la evaluación biológica del aceite fueron aislamientos clínicos provistos por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de CIENCIAS DE LA SALUD de la Universidad del Cauca, se utilizaron las cepas *Klebsiella pneumoniae* ATCC10033 y *Staphylococcus aureus* ATCC25923. Para evaluar la sensibilidad de estos microorganismos al aceite se empleó el método de difusión en agar de Kirby-Bauer y el método de microdilución. Los procedimientos se realizaron en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca que se rige por la normatividad NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standardization, 1997, 1998, 2000, 2003).

Los experimentos se realizaron bajo un diseño completo al azar con parcela dividida, donde los tratamientos correspondieron al aceite en diferentes concentraciones y el hidrolato; el etanol como control negativo y antibiótico como control positivo. Cada tratamiento contó con tres repeticiones. Las dos bacterias se consideraron como variables dependientes y las variables de respuesta fueron el halo de inhibición, en el caso de la prueba de difusión en agar (Kirby-Bauer) y la densidad óptica (OD) para el caso de microdilución hubo tres controles que fueron: control negativo (BHI+Antibiótico+Bacteria), control de etanol y control positivo (BHI+Agua+ Bacteria).Cada experimento contó con tres réplicas, lo que arrojó 9 datos por tratamiento.

Inicialmente se activaron los cultivos en agar Mueller-Hinton por incubación durante 24 horas. A partir de los cultivos frescos se tomaron 4 a 5 colonias aisladas de *S. aureus* y 4 a 5 colonias de *K. pneumoniae* para preparar suspensiones en solución salina con una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml equivalente al standard 0,5 de turbidez en la escala de MacFarland (Figura 8). Esta lectura se realizó en el equipo DENSIMAT Una vez preparada la suspensión se procedió con el montaje del método de microdilución y el método de difusión, como se explica a continuación.



Figura 8. Lectura de turbidez en la escala de MacFarland

3.1.4 Método de difusión en agar. En un lapso de tiempo óptimo de 15 minutos después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo con *S. aureus*, se sumergió un aplicador de algodón en ella. El aplicador fue rotado varias veces y presionado firmemente contra la pared interna del tubo sobre el nivel de líquido para remover el exceso de inóculo. Se incubaron las superficies de tres placas de agar Mueller–Hinton extendiendo el aplicador de un extremo a otro de la caja de petri. Este procedimiento fue repetido dos o más veces, rotando la placa aproximadamente 60° C después de cada aplicación para asegurar una distribución uniforme del inóculo, como paso final se pasó sobre los bordes del agar. Este mismo procedimiento se realizó con el inóculo de *K. pneumoniae*.

Se dejó secar el extendido bacteriano y se colocaron en cada caja de petri discos de papel whatman N° 2 estériles, de 5 mm de diámetro que luego fueron embebidos con el aceite de *H. mellissoides* diluido en etanol al 96% según los tratamientos. (Figura 9); cada experimento fue diseñado con tres replicas para cada bacteria, con los 6 tratamientos.

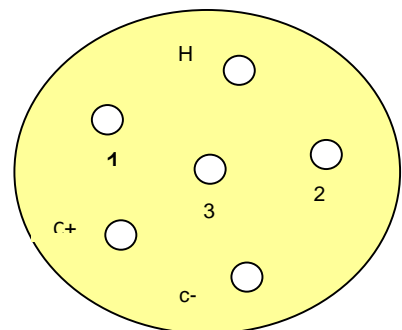
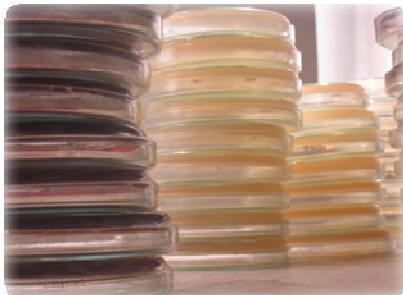


Figura 9. Montaje difusión en Agar:

Donde:

1: Aceite al 0.1 %

2: Aceite al 0.05 %

3: Aceite al 0.01 %

C +: Control + antibiótico (*Klebsiella pneumoniae*, (Aztreonam 30µg) y para *Staphylococcus aureus*, (Sulfamethoxazole-Trimethoprim 250µg)

C -: Control - (etanol 96%)

H: Hidrolato

Después de adicionados los tratamientos, se dejaron reposar las cajas de petri por 15 minutos a temperatura ambiente. Todo el procedimiento se realizó en cámara de flujo laminar marca Sony Cybershot DSC-w80. La incubación (Figura 10) se realizó a 35°C en atmósfera aerobia (Figura 10). A las 24 horas, a las 48 horas y a las 72 horas se realizaron mediciones del halo de inhibición.



Figura 10. Incubación *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*

Los diámetros de la zona de inhibición completa fueron medidos en mm pasando por el centro del disco usando una regla (Figura 11) esto se llevo a cabo según (National Committe for Clinical Laboratory Standars. 1999,1997). El margen de las zonas de inhibición se consideró como el área donde no se observó crecimiento bacteriano.

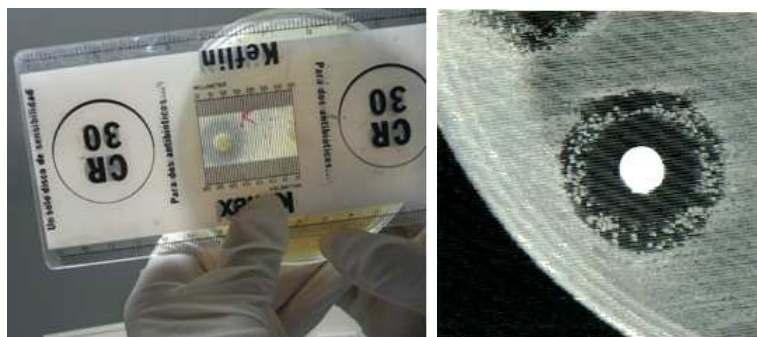


Figura 11. Medición de halos de inhibición

Se calculó el porcentaje de inhibición comparando la actividad de cada uno de los tratamientos con la del antibiótico, según la fórmula propuesta por (Martinez, 1996; Rosa *et al*, 2006), porcentaje de efecto inhibitorio se calculó mediante la fórmula propuesta por (Martinez, 1996).

$$\% \text{ efecto inhibitorio} = \frac{\text{media diam. Halo inhib. del extracto} \times 100}{\text{media diam. Halo inhib. del control positivo}}$$

3.1.5 Método de microdilución en caldo. Esta metodología se realizó en placas de Elisa de 96 pozos. Para ello se sirvieron 6 columnas de pozos con medio de cultivo infusión cerebro corazón (BHI), 3 de las cuales se inocularon con *S. aureus* y las 3 restantes con *K. pneumoniae*. Se tomaron 2 ml de la suspensión preparada con una turbidez correspondiente a 0.5 de Mc Farland y se mezclaron con 38 ml de agua destilada estéril (dilución 1:20) para que la concentración final de bacterias en cada pozo fuera de 5×10^5 UFC/ml.

Los tratamientos evaluados fueron los mismos ya descritos en la metodología de Kirby-Bauer. Cada pozo contenía: 50 μ l de medio BHI, 10 μ l de inóculo bacteriano, 10 μ l de tratamiento y 30 μ l de agua para un volumen final de 100 μ l. El diseño del experimento se realizó como se muestra en la (Figura 12).

3	1	C		3	1	C			
2	C-	1		2	C-	1			
H	3	H		H	3	H			
C	C+	2		C	C+	2			
1	C	C+		1	C	C+			
C-	2	C-		C-	2	C-			
C+	C-	3		C+	C-	3			
BHI	BHI	BHI		BHI	BHI	BHI			

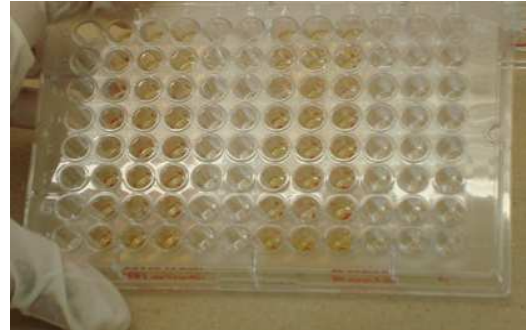


Figura 12. Distribución de Microdilución en caldo

Donde:

1: Aceite al 0.1 %

2: Aceite al 0.05 %

3: Aceite al 0.01 %

C-: Control – (antibiótico Cloramphenicol 2µg/ml, para las dos bacterias)

C: control de etanol

C+: (BHI+Agua+Bacteria)

H: Hidrolato al 0.5 %

BHI: medio de cultivo como control de esterilidad

Todo el procedimiento se realizó en cámara de flujo laminar Sony Cybershot DSC-w80. Finalmente se cubrió la placa con papel parafilm y se procedió a incubar a 37°C por espacio de 18 horas. Posterior a la incubación se midió la densidad óptica usando un lector Elisa STAT FAA 3200 AWARENESS TECHNOLOGY INC (Figura 13) a una longitud de onda de 630 nm. El valor obtenido para cada pozo es una medida espectrofotométrica que se relaciona con la turbidez de la suspensión bacteriana, por lo tanto que altos valores de absorbancia o densidad óptica (OD) indica mayor turbidez debido a la cantidad de células como resultado del crecimiento bacteriano.



Figura 13. Lector de Elisa STAT FAA 3200 AWARENESS TECHNOLOGY INC

3.1.6 Analisis de los datos. Con los datos obtenidos se realizó una matriz de datos en excel. El análisis estadístico de los datos se efectuó con el programa SPSS (Statistical Package for social Scientific), versión académica 11.0. Se definieron las estadísticas descriptivas y se realizó una prueba de normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Además se realizaron las pruebas no paramétricas H de Kruskall-Wallis y U de Mann-Whitney, para el caso de la método Kirby-Bauer y para la microdilucion se definieron las estadísticas descriptivos y se realizó una prueba no parametrica ajustada con Kruskall-Wallis y una prueba U de Mann-Whitney.

4. RESULTADOS

4.1 RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL

Se realizó con el volumen de destilado del aceite esencial obtenido en un balón de 250ml y luego se depositó en el erlenmeyer (matraz). Por el método gravimétrico volumétrico se determinó el Porcentaje de Rendimiento de Aceite esencial (%RAE) con la siguiente expresión:

$$\%RAE = \text{Vol. AE (ml)} / \text{Pmuestra (g)} \times 100$$

Donde:

Vol. AE: Volumen del aceite esencial obtenido en mililitros. (3ml)

Pmuestra: Peso de la muestra a destilar en gramos. (1.341.20g)

El rendimiento de aceite esencial fue de 0.022por ciento v/p

RENDIMIENTO DE HIDROLATO: Para el caso de hidrolato el rendimiento fue de 80% puesto que se adicionó 500ml de agua destilada y se recogió 300ml de hidrolato, con el cual se trabajó para ser evaluado frente a las bacterias. Posteriormente, el hidrolato fue esterilizado con todas las asepsias que este necesita.

4.1.2 Estandarización de la obtención del aceite y hidrolato de *Hyptis melissoides*. La obtención del aceite de *Hyptis melissoides* fue una sustancia de color amarilla, olor dulce, sabor picante, con un PH 7, además de presentar estas características es una sustancia muy densa (Figura 14). En cuanto al hidrolato, es una sustancia de olor fuerte, sabor amargo, color transparente y con un PH 6, (Figura 15).



Figura 14. Aspecto del Aceite Esencial



Figura 15. Aspecto del Hidrolato

4.1.3 Determinación de la composición química del aceite esencial de *Hyptis melissoides*. El análisis del aceite esencial mediante Cromatografía de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas (GC-MS), permitió identificar 59 componentes químicos que se presentan en la (figura 16 y 17) y (tabla 2).

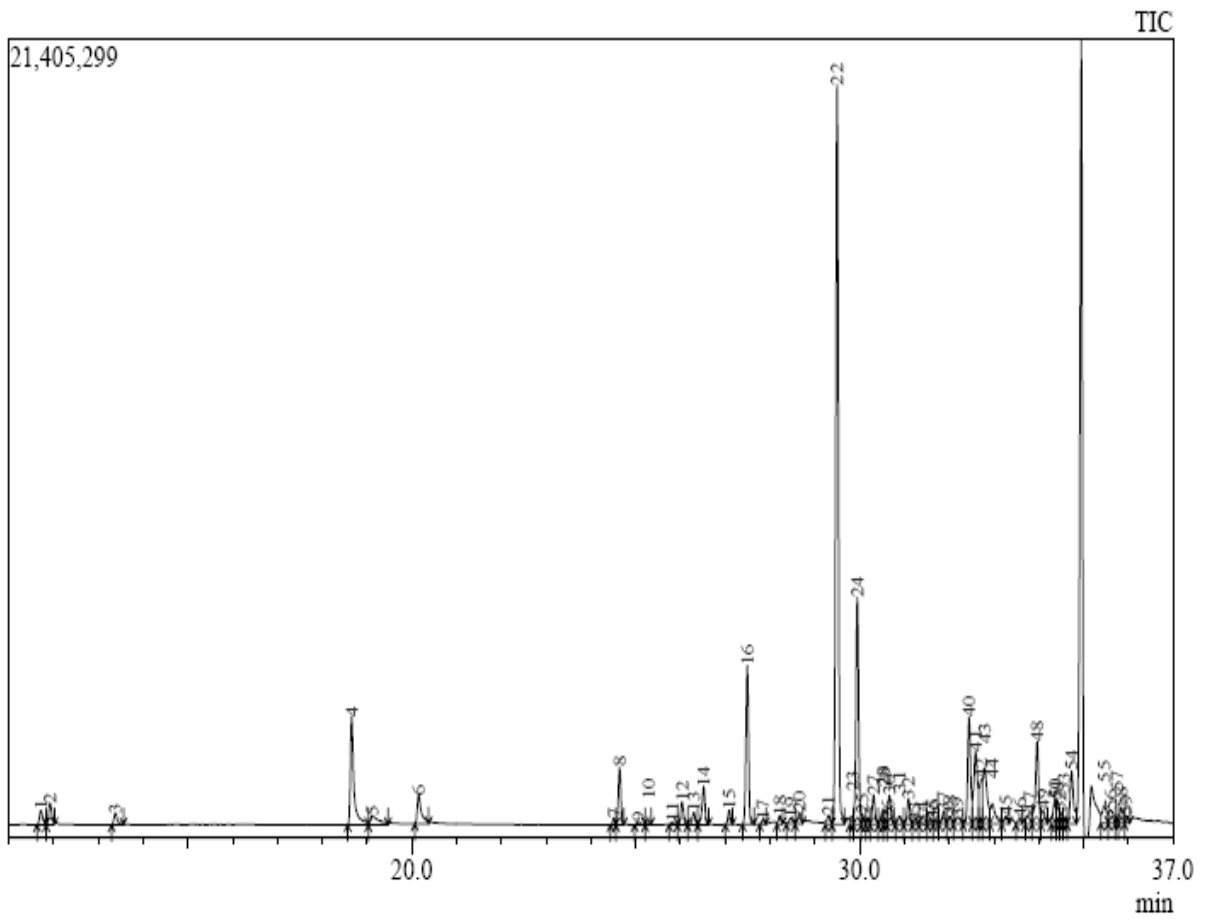


Figura 16. Cromatografía de Gases del Aceite Esencial de *Hyptis melissoides*

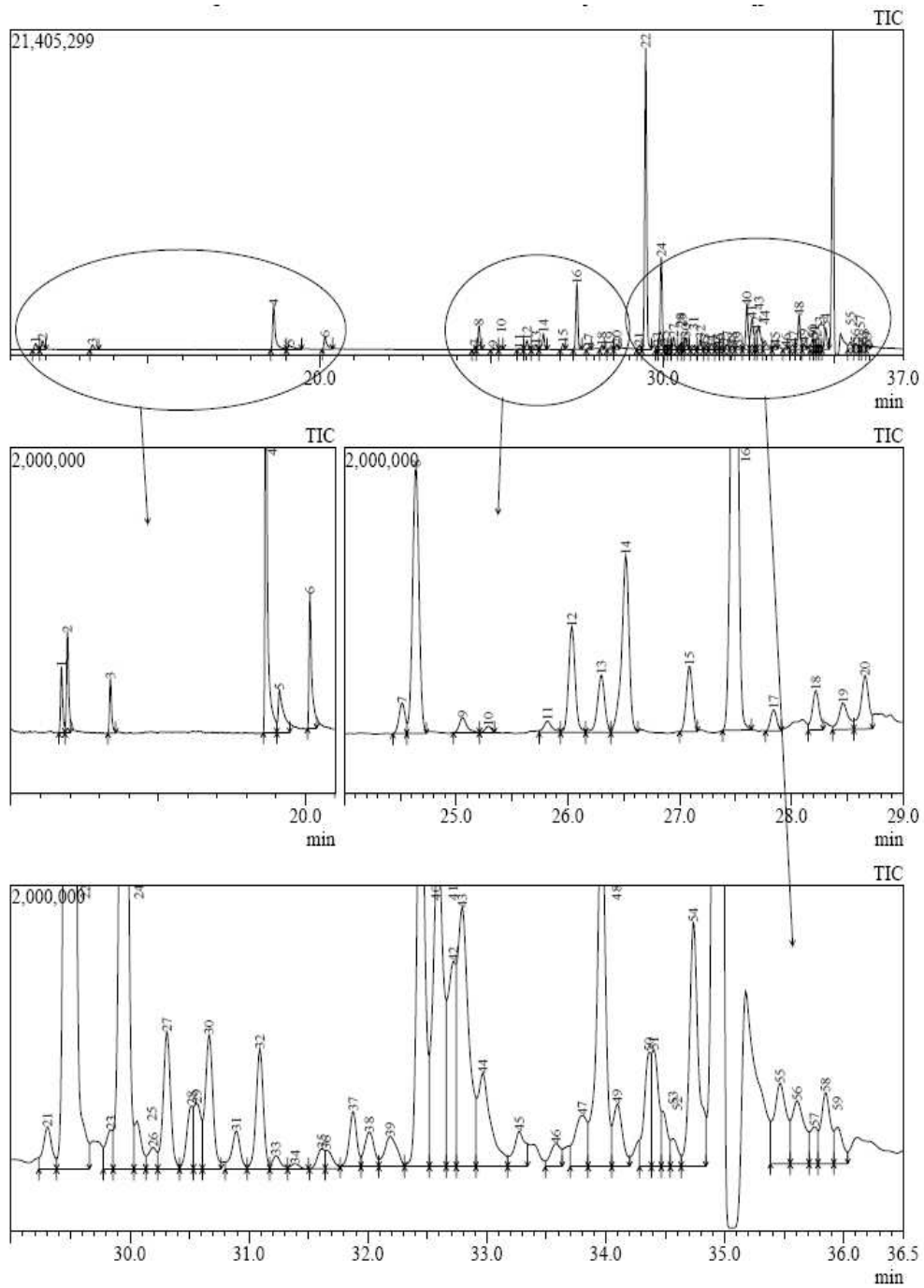


Figura 17. Cromatografía de Gases del aceite esencial de *Hyptis melissoides*

Tabla 2. Composición Química de los Componentes del Aceite Esencial de *Hyptis melissoides*.

ID#	R.Time	Area	Conc.	Conc.Uni	Nombre
1	11.713	1940508	0.700	%	Benzene, methyl(1-methylethyl)- (CAS)
2	11.919	2914334	1.052	%	D-Limonene
3	13.375	1577447	0.569	%	1,4-Cyclohexadiene,1-methyl-4-(1-methylethyl)-
4	18.654	15971918	5.766	%	(3E,5Z)-1,3,5-Undecatriene
5	19.114	3098271	1.118	%	(E,E)-1,3,5-Undecatriene
6	20.150	5026705	1.815	%	Acetic acid, octyl ester
7	24.516	675175	0.244	%	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2-(1-methylethenyl)-4-
8	24.639	6002506	2.167	%	.delta.-Elemene
9	25.058	453931	0.164	%	.alpha.-Cubebene
10	25.288	140949	0.051	%	11-Methylene-tricyclo[5.3.1.1(2,6)]dodecane
11	25.816	376436	0.136	%	Ylangene
12	26.034	2434435	0.879	%	Copaene
13	26.298	1399668	0.505	%	.BETA. BOURBONENE
14	26.518	4574965	1.651	%	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)
15	27.087	1468063	0.530	%	1H-Cycloprop[e]azulene, 1a,2,3,4,4a,5,6,7b-octahydro-1,1
16	27.490	16695794	6.027	%	TRANS(.BETA.)-CARYOPHYLLENE
17	27.840	474227	0.171	%	GERMACRENE-D
18	28.217	797253	0.288	%	ARISTOLEN
19	28.462	750499	0.271	%	1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-me
20	28.658	1195119	0.431	%	.alpha.-Humulene
21	29.307	912077	0.329	%	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-met
22	29.497	81193986	29.309	%	GERMACRENE-D
23	29.841	773691	0.279	%	.alpha.-Copaene
24	29.948	25023823	9.033	%	Bicyclogermacrene
25	30.058	801106	0.289	%	.alpha.-Muurolene
26	30.194	459523	0.166	%	.delta.-Cadinene
27	30.311	3204458	1.157	%	.BETA. ELEMENE
28	30.517	1272730	0.459	%	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-met
29	30.562	1431525	0.517	%	Silane, dimethyldi-1-propynyl-
30	30.665	3087999	1.115	%	.delta.-Cadinene
31	30.894	899180	0.325	%	.delta.-Elemene
32	31.092	2759842	0.996	%	1H-Cycloprop[e]azulene, 1a,2,3,4,4a,5,6,7b-octahydro-1,1

33	31.228	361812	0.131	%	.alpha.-Muurolene
34	31.387	149135	0.054	%	Norbornane, 2-chloro-1,5,5-trimethyl-, exo- (CAS)
35	31.612	525398	0.190	%	.beta.-Selinene
36	31.650	323798	0.117	%	2,5-Cyclooctadien-1-ol, acetate
37	31.876	1375272	0.496	%	Germacrene B (CAS)
38	32.013	1078233	0.389	%	VERIDIFLOROL
39	32.186	1119166	0.404	%	1,5-epoxysalvial-4(14)-ene
40	32.444	12655046	4.568	%	(-)-Spathulenol
41	32.590	11187919	4.039	%	Caryophyllene oxide
42	32.720	5442753	1.965	%	(-)-Globulol
43	32.792	9582206	3.459	%	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester (CAS)
44	32.966	3529596	1.274	%	VERIDIFLOROL
45	33.272	1143090	0.413	%	Ledol
46	33.581	971395	0.351	%	Cubenol
47	33.803	1764494	0.637	%	VERIDIFLOROL
48	33.964	10614375	3.832	%	1H-Cycloprop[e]jazulen-7-ol, decahydro-1,1,7-trimethyl-4
49	34.097	1690603	0.610	%	1H-Cycloprop[e]jazulen-7-ol, decahydro-1,1,7-trimethyl-4
50	34.366	2487899	0.898	%	.tau.-Cadinol
51	34.403	2530099	0.913	%	EXOBORNYL ACETATE
52	34.475	987781	0.357	%	Copaene
53	34.565	606258	0.219	%	Tricyclo[4.4.0.0(2,7)]dec-8-ene-3-methanol, .alpha.,.alpha
54	34.737	7312978	2.640	%	.alpha.-Cadinol
55	35.464	3135110	1.132	%	4-OCTYLBUTAN-4-OLIDE
56	35.608	2622285	0.947	%	.DELTA.1,.delta.-Cyclohexanebutanol, .alpha.-ethynyl-
57	35.754	898373	0.324	%	Murolan-3,9(11)-diene-10-peroxy
58	35.848	2208530	0.797	%	2,6,10,14-Hexadecatetraen-1-ol,3,7,11,15-tetramethyl-, ac
59	35.948	931633	0.336	%	Juniper camphor

Tabla 3. Composición Química de los componentes respresentativos del aceite esencial de *Hyptis melissoides*

SESQUITERPENOS	ALPHA.-CADINOL Conc. (2.640)
	BICYCLOGERMACRENE Conc. (9.033)
	BETA. ELEMENE Conc. (1.157)
	CYCLOHEXANE, 1-ETHENYL-1-METHYL-2,4-BIS(1-METHYLETHENYL) Conc. (1.651)
	1H-CYCLOPROP[E]AZULEN-7-OL, DECAHYDRO-1,1,7-TRIMETHYL-4- Conc. (3.832)
	CARYOPHYLLENE OXIDE Conc. (4.039)
	DELTA.-CADINENE Conc. (1.115)
	(-)-GLOBULOL Conc. (1.965)
	GERMACRENE-D Conc. (29.309)
	(-)-SPATHULENOL Conc. (4.568)
	TRANS (.BETA.)-CARYOPHYLLENE Conc. (6.027)
	VERIDIFLOROL Conc. (1.274)
	MONOTORPENOS
DELTA.-ELEMENE Conc. (2.167)	
(3E,5Z)-1,3,5-UNDECATRIENE Conc. (5.766)	
(E,E)-1,3,5-UNDECATRIENE Conc. (1.815)	
ETER CICLICO	4-OCTYLBUTAN-4-OLIDE Conc. (1.132)
ESTER	ACETIC ACID, OCTYL ESTER Conc. (1.815)
	1,2-BENZENEDICARBOXYLIC ACID, DIETHYL ESTER (CAS) Conc. (3.459)

En esta tabla se encuentran los componentes que marcaron concentraciones a partir de 1.052, hasta 29.309, siendo los más representativos en la lectura de cromatografía. Entre ellos tenemos; Sesquiterpenos, Monotorpenos, Eter cíclico y Ester. Cabe resaltar que los resultados más elevados los obtuvieron el grupo de los Sesquiterpenos, en cuanto a concentración y componentes químicos, tales como: **GERMACRENE-D**, con una Conc. **(29.309)** y **BICYCLOGERMACRENE**, con una Conc. **(9.033)**, que se encuentran especificados en la (Figuras 18 y 19). Por lo que se considera que **GERMACRENE-D**, **BICYCLOGERMACRENE**, pertenecientes al grupo de los sesquiterpenos tienen efectos antibacteriano, esto se podría atribuir que al ser compuestos perteneciente a los terpenos los clasifica en componentes importantes para ser evaluados frente a bacterias de importancia clínica (Rivero-Cruz *et al.*, 2006 Falcão; 2003; Brophy *et al.*, 2002; Pérez Alonso *et al.*, 1999).

Además de **GERMACRENE-D**, **BICYCLOGERMACRENE**, se encontró compuestos pertenecientes a los Sesquiterpenos con concentraciones muy considerables que se encuentra especificado en (Anexo 1-10), para el caso de

los Monoterpenos se encuentra en el (Anexo 11-14), para el caso del grupo pertenecientes Eter cíclico (Anexo 15) y para el grupo de Ester (Anexo 16-17).

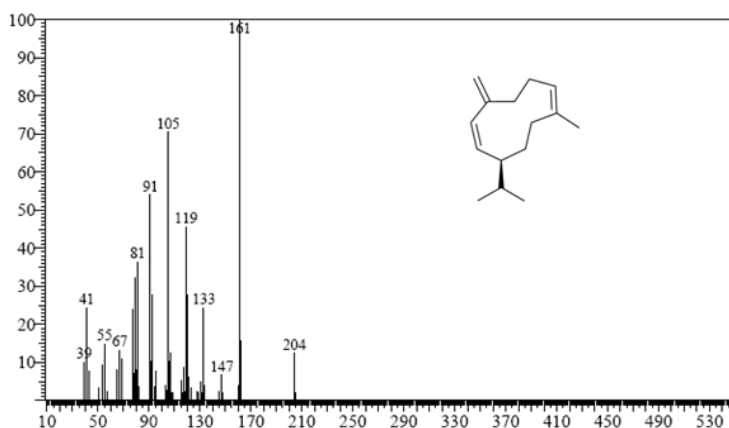


Figura 18. Cromatografía de la estructura Germacrene-D (C₁₅H₂₄)

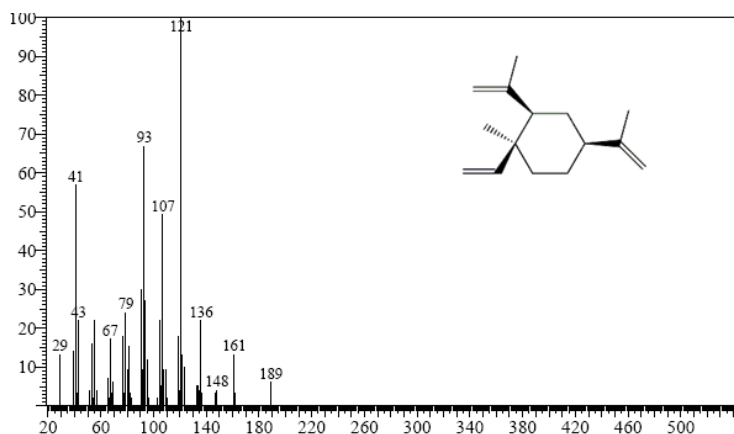


Figura 19. Cromatografía de la estructura Bicyclogermaene (C₁₅H₂₄).

4.1.4 Prueba para método de difusión en agar. En esta prueba se tuvo encuentra la asepsia necesaria con el aceite esencial de *Hyptis melissoides* se impregno papel filtro whatman n° 2 estériles, de 5 mm de diámetro a diferentes

concentraciones. Sobre el agar Mueller-Hinton se realizo una inoculacion de las bacterias. *S. aureu*, *k. pneumoniae*. Cuya concentracion era de 10^5 , luego se coloco los discos de papel filtro con el aceite sobre la inoculacion bacteriana y se llevaron a incubar. Después de las 24 horas de incubación a 37 °C se revisaron los controles positivos y se verificó que los ensayos no sufrieron alteraciones por contaminación microbiana diferentes a las bacterias inoculadas.

4.1.5 Analisis de resultados (Metodo Kirby-Bauer). Con base en el análisis descriptivo de los datos (Anexo 18), se realizo un gráfico barras (Figuras 19), donde observa el efecto que tuvieron los diferentes tratamientos sobre el crecimiento de las bacterias.

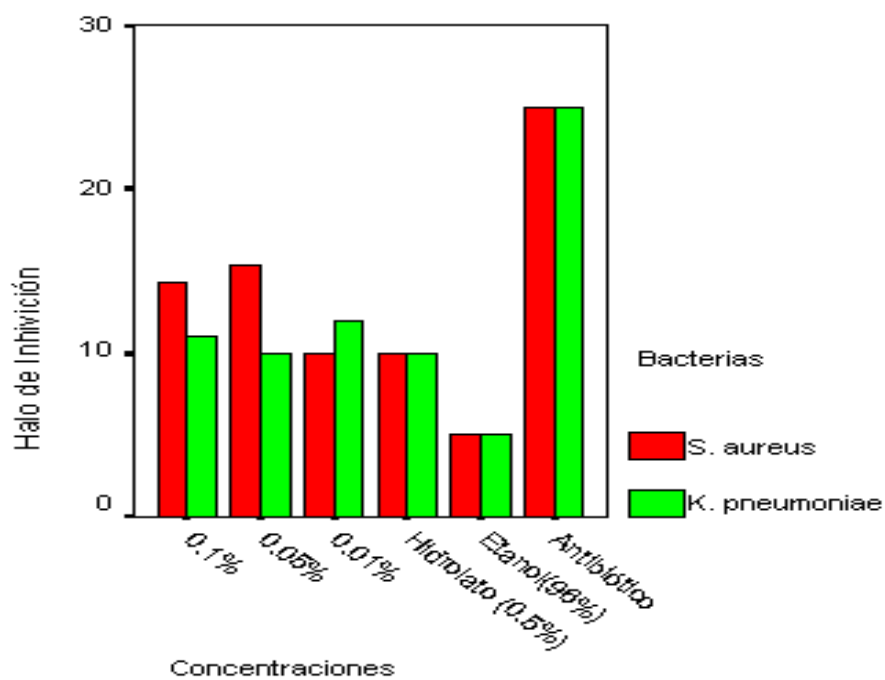


Figura 20. Halo de inhibición (en mm) en cultivos de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* en presencia de aceite esencial de *H. mellisoides* a diferentes concentraciones.

La prueba de kolmogorov-Smirnov (Anexo 19), realizada con un nivel de confiabilidad del 95 %, arrojó que los datos correspondientes al halo de inhibición no se distribuyeron normalmente. Por lo tanto, se procedió a analizar los datos con la prueba no para métrica de Kruskal-Wallis (Anexo 20), encontrándose que el efecto de los tratamientos fue igual sobre las dos bacterias, es decir que las diferencias observadas en la gráfica, entre los halos de inhibición de las bacterias, producidos por las tres diferentes concentraciones del aceite, no son estadísticamente significativas y que este efecto se mantuvo hasta las 72 horas de incubación.

Por el contrario, entre los tratamientos evaluados sí hubo diferencias significativas. La prueba U de Mann-Whitney (Anexo 22), permitió entonces determinar cuales fueron aquellos tratamientos que ocasionaron halos de inhibición diferentes en tamaño.

Los antibióticos Sulfamethoxazole-Trimethoprim a una concentración de (250 μ g) para *Staphylococcus aureus*, y Aztreonam a una concentración de (30 μ g) para *Klebsiella pneumoniae* se clasifican dentro de los antibióticos con mayor actividad antimicrobiana, por lo cual fueron usados como controles positivos y produjeron halos de inhibición de 25 mm, siendo estos tratamientos los que originaron diferencias cuando se compararon uno a uno con los demás (Tabla 4).

No se encontraron diferencias significativas entre la actividad antibacteriana del aceite al 0.1% al 0.05 %, al 0.01 %, pero sí se encontraron diferencias entre las actividades del aceite y las del hidrolato.

Tabla 4. Promedios de los halos de inhibición, tanto del grupo control como del experimental.

Promedio del diámetro del halo de inhibición de cada caja petri con los diferentes antibióticos para cada bacteria; Sulfamethoxazole-Trimethoprim a una concentración de (250mg) para <i>Staphylococcus aureus</i>, y Aztreonam a una concentración de (30mg) para <i>Klebsiella pneumoniae</i> y los diferentes concentraciones del aceite evaluado		
<i>Staphylococcus aureus</i>	Total del promedio de las concentraciones	12.4
	Total del promedio del promedio del antibiótico	25
<hr/>		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Total del promedio de las concentraciones	10.8
	Total del promedio del antibiótico	25

Porcentaje de efecto inhibitorio del aceite esencial de *Hyptis melissoides* Sobre *Staphylococcus aureus*.

$$\% \text{ efecto inhibitorio} = \frac{\text{Media diam. Halo inhib. Del extracto} \times 100}{\text{Media Diam. Halo inhib. Del control positivo}}$$

$$\% \text{ efecto inhibitorio} = \frac{12.4 \times 100}{25} = 49.6\%$$

Porcentaje de efecto inhibitorio del aceite esencial de *Hyptis melissoides* Sobre *Klebsiella pneumoniae*.

$$\% \text{ efecto inhibitorio} = \frac{\text{media diam. Halo inhib. Del extracto} \times 100}{\text{Media Diam. Halo inhib. Del control positivo}}$$

$$\% \text{ efecto inhibitorio} = \frac{10.8 \times 100}{25} = 43.2\%$$

De acuerdo con el porcentaje de efecto inhibitorio calculado mediante la fórmula propuesta por Martínez, (1996). Se concluye que las concentraciones del aceite esencial de *Hyptis melissoides*; presenta mejor resultado para *Staphylococcus aureus* con un porcentaje inhibitorio de 49.6%, en comparación con los resultados de *Klebsiella pneumoniae* que presentó un porcentaje inhibitorio de 43.2%. Los porcentajes de efecto inhibitorio calculados usando como referencia los controles positivos se muestran en la (tabla 4).

Tabla 5. Concentraciones del aceite esencial de *Hyptis melissoides* y porcentaje de efecto inhibitorio que produjeron sobre *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*

concentraciones	<i>S. aureus</i> % de efecto inhibitorio	<i>K. pneumoniae</i> % de efecto inhibitorio	Total % de efecto inhibitorio
Aceite al 0.1 %	57,3	44,0	48,7
Aceite al 0.05 %	61,3	40,0	50,7
Aceite al 0.01 %	40,0	48,0	44,0
Hidrolato al 0.5 %	40,0	40,0	40,0
Etanol al 96 %	20,0	20,0	20,0

Primero que todo se debe observar que el etanol al 96 % usado como control negativo, ocasionó un halo de inhibición en las bacterias, que se presentó justo debajo del disco del filtro, es decir que este diámetro de inhibición correspondió al diámetro del disco, 5 mm.

Aunque es sabido que el etanol es un agente químico usado para destruir microorganismos porque actúa desnaturalizando las proteínas, disolviendo las capas lipídicas y como deshidratante, fue utilizado como solvente para realizar las diluciones del aceite, debido a la naturaleza lipídica de éste, pero hay que anotar también que es un compuesto que se evapora rápidamente y por tanto su acción inhibitoria fue solo del 20 %. (Martínez, 1996; Rosa *et al*, 2006; Rojas *et al.*, 2010; Reyes *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2004; Murillo *et al.*, 2004; Martín *et al.*, 2004; Figueroa y Carbajal, 2000).

El hidrolato al 0.5 % produjo halos de inhibición similares para ambas bacterias con un porcentaje de efecto inhibitorio importante (44 %), esto probablemente

debido a la presencia de aceite que no se logró recuperar totalmente durante la separación del hidrolato, compuesto que está constituido por residuos que se encuentran en el aceite, que son conocidos como azeótropos que participa como vehículo de dilución al aceite esencial y además por la participación de otros compuestos tales como: terpenos sesquiterpenos, monoterpenos entre otros (Núñez, 2008).

De acuerdo con los parámetros estipulados por National Committee for Clinical Laboratory Standards 1999,1997, los antibióticos usados para el ensayo fueron Sulfamethoxazole-Trimethoprim para *Staphylococcus aureus* y Aztreonam para *Klebsiella pneumoniae*, ambos produjeron halos de inhibición de 25mm; estos resultados se compararon con los halos producidos por el aceite para catalogar a las bacterias evaluadas como susceptibles o resistentes al extracto vegetal. Para *Staphylococcus aureus*, la concentración 0.05% formó un halo de inhibición de 16mm (siendo el mayor para la bacteria) por tanto se considera susceptible al aceite y para el caso de *Klebsiella pneumoniae*, esta concentración también ocasionó un halo de inhibición de 16mm, pero respecto al antibiótico se clasifica como bacteria con sensibilidad intermedia al aceite esencial (Tabla. 8).

Tabla 6. Susceptibilidad de las bacterias con base en la zona de inhibición de acuerdo a los antibióticos sulfamethoxazole-Trimethoprim y Aztreonam

	Zona de inhibición dependiendo del antibiótico		
	≤ 10	11-15	≥22-26
<i>Staphylococcus aureus</i> (Sulfamethoxazole-Trimethoprim)	Resistente	Medianamente resistente	Suceptible
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (Aztreonam)	≤ 15	16-21	>16
	Resistente	Medianamente resistente	Suceptible

4.1.6 Analisis de resultados prueba de microdilución en caldo. Con base en el análisis descriptivo de los datos (Anexo 23), se realizó un gráfico de barras (Figuras 20), donde se observa el efecto que tuvieron los diferentes tratamientos sobre el crecimiento de las bacterias.

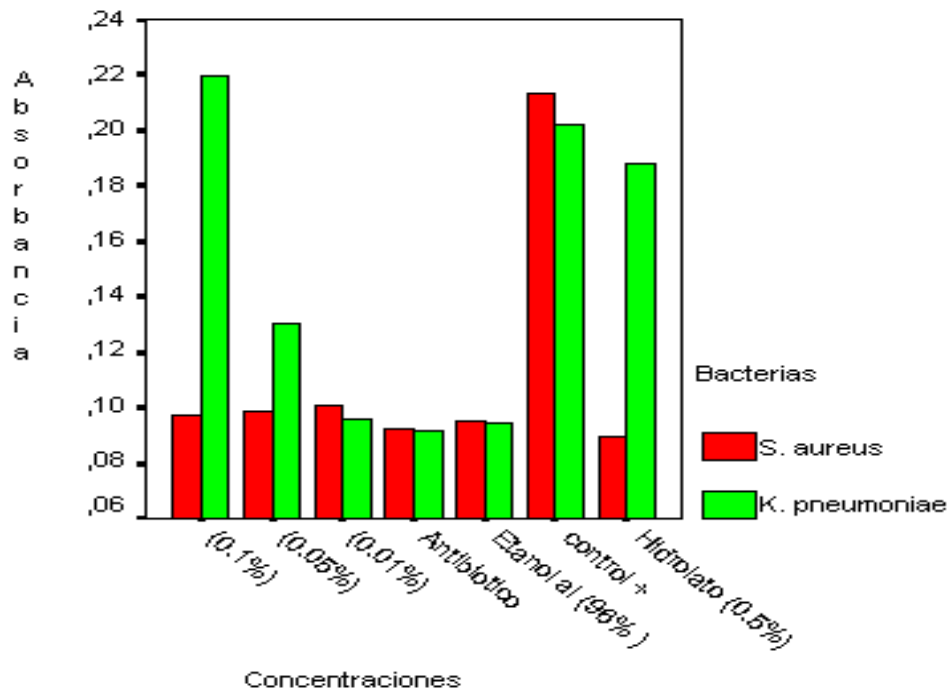


Figura 21. Valores de Absorbancia de los cultivos de *S. aureus*, *K. pneumoniae* en presencia de aceite esencial de *H. mellisoides* a diferentes concentraciones

Según la prueba no paramétrica U de Mann Whitney (Anexo 26), hubo diferencias significativas entre las respuestas a los tratamientos dependiendo del tipo de bacteria. Como puede observarse, todos los tratamientos (control positivo) detuvieron el crecimiento de *S. aureus* en medio líquido. Mientras que *K. pneumoniae* fue resistente al aceite al 0.1%, al hidrolato al 0.5% y medianamente resistente al aceite al 0.05%.

El antibiótico que fue utilizado en el ensayo de microdilucion fue Cloramphenicol, a una concentración de (2µg/ml) para *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, puesto que se clasifican dentro de los antibióticos con mayor actividad antimicrobiana, por lo cual fue usado como control negativo, este produjo menor turbidez al inhiere el crecimiento bacteriano, siendo esta tratamiento el que origina diferencia en comparaciones con las demás concentraciones diseñadas para este método.

El caso de *Klebsiella pneumoniae* es diferente si se tiene en cuenta que la producción de un polisacárido capsular hidrofílico es característico de este género (Edwards y Ewing, 1986). El etanol disuelve los polisacáridos, por tanto es probable que a esto se deba la pérdida de resistencia gradual observada a medida que disminuye la concentración del aceite, ya que este se diluye en etanol al 96%, la cápsula se disuelve y los componentes del aceite pueden ingresar al citoplasma celular. En el caso del hidrolato, la bacteria fue resistente ya que la cápsula funciona como una barrera que impide el paso de solutos (Edwards y Ewing, 1986)

5. DISCUSIÓN

Hyptis melissoides (*Mastranto del Juanambú*) proveniente de la vereda la Enhillada, Departamento de Nariño, (N: 1° 13'.0" W: 77°22'.0"). Tuvo un rendimiento del aceite esencial de 0.22 por ciento v/p, este resultado podría estar sujeto a muchos factores como: variedad de la especie, medio ecológico y zonas Geográficas, donde esta fue colectada (Falcão, 2003), también otro factor que pudo influir en el rendimiento del aceite se atribuiría al sistema de extracción utilizado que no fue el más adecuado, pudiéndose utilizarse sistemas más modernos como: La hidrodestilación que permite obtener aceites con mayor proporción de compuestos oxigenados y el método continuo siendo el más utilizado en la investigación de extracción de aceites esenciales.

Respecto a la composición química cualitativa determinada por Cromatografía de Gases /Espectrometría de Masas (CG/EM), se han identificado 59 compuestos (Tabla 2), que en su gran mayoría están conformados por terpenos, sesquiterpenos, monoterpenos, entre otros (Tabla 2). Estos compuestos se han encontrado en otras especies del género de la especie de; *H. fasciculata*, *H. tetracephala*, *H. heterodon*, *H. elegans*. (Falcão, 2003). Entre los más representativos encontramos, **Germacrene-D**, **Bicyclogermacrene** para el caso de los sesquiterpenos y para los monoterpenos, encontramos los más representativos d-limoneno, delta.-elemeno, (3e,5z)-1,3,5-undecatriene (Tabla 3), compuestos encontrados en; *H. suaveolens* (Azevedo *et al.*, 2001; Hac *et al.*, 1996), *H. mutabilis* (Bailac *et al.*, 1999), *H. pectinata* (Brophy y Lassak, 1987), estos compuestos fueron evaluados frente a cepas bacterianas; *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*; con unas concentraciones, 0.05%, 0.10% mostrando una efectividad del 80%; es por ello que al poseer estas plantas estos compuestos y mostrando tan gratificantes resultados se podría atribuir que el 50% de efectividad que se tuvo en nuestra investigación; con las concentraciones 0.1%, 0.5% y 0.01%, evaluadas frente a las cepas *S. aureus* ATCC25923 y *K. pneumoniae* ATCC10033 sería gracias que el aceite de *Hyptis melissoides* también los posee, aunque no sea claro puesto que en este trabajo no fueron evaluados por separado; pero si fueron los más representativos, lo que implica que no sería seguro la efectividad de estos compuestos sino que se atribuiría a la agrupación de los 59 compuestos encontrados en Cromatografía de Gases /Espectrometría de Masas (CG/EM).

El género *Hyptis* se considere de gran interés en el mundo entero (Falcão, 2003), puesto que la características de estas plantas es de poseer compuestos con alto índice de efecto antibacterial; tales como: sesquiterpenos, monoterpenos (Reyes *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2004; Murillo *et al.*, 2004), además de tener estas propiedades, son compuestos volátiles con olores intensamente pungentes, responsables de las fragancias y las sensaciones de olor-sabor de muchas plantas (Dewick, 1997) y en este caso no es la excepción, el olor dulce y sabor amargo del aceite de *Hyptis melissoides* seguramente es gracias a los monoterpenos que esta especie tiene, además de estos compuestos encontramos otros compuestos como: Ester, Éter cíclico entre otros (Tabla 3), como lo esta escrito en (Tabla 2).

Podemos corroborar que *Hyptis melissoides*, es una especie de gran importancia puesto que al tener dichos compuestos, podría ser de gran utilidad en la investigación tanto a nivel farmacéutico como a nivel fúngico; sin embargo hasta la fecha, sobre esta especie no se ha reportado ningún trabajo de investigación lo que la hace aun más interesante nuestro objetivo, de estudiar la diversidad de estos componentes anteriormente mencionados y poderlos evaluar frente a bacterias de gran importancia Clínica como: *S. aureus* ATCC25923 y *K. pneumoniae* ATCC10033.

Aparte de evaluar el aceite se pudo evaluar el hidrolato de *Hyptis melissoides*, compuesto que esta constituido por moléculas de bajo peso molecular, encontradas en el aceite; conocidas como azeótropos (Núñez, 2008). Cabe aclarar que dicho compuesto no es muy utilizado en la investigación, pero si hay reportes de uso en la agricultura como: repelente previniendo enfermedades causadas por hongos y bacterias (Corporación Investigación y desarrollo Agropecuario, 2006), de igual manera son utilizados como productos de higiene, cosmética o como complementos alimenticios. En uso externo, pueden emplearse como loción dermatológica (Núñez, 2008).

En la metodología Kirby-Bauer se concluiría que las dos bacterias son vulnerables a las diferentes concentraciones esto se podría atribuir en gran parte a los terpenos como: sesquiterpenos, monoterpenos (Tabla 13), puesto que son los compuestos con mayor concentración en la cromatografía. Además en diversos trabajos han demostrado que son componentes principales de los aceites esenciales de diversas especies tales como: *H. fasciculata*, *H. tetraphala*, *H. heterodon*, *H. elegans*. Se encontró compuestos tales como: (Ledol, Nanoato de

etila, 2H Benzociclohepten-2-ona 1, 4a, 5, 6, 7, 8, 9, 9a-octaidro-4a-metil, Patchoulano, 4, 8, 12, 16-tetrametileptadecan-4-olido, Ursenol-28, b - Sitosterol, Estigmasterol, Ácido Caféico, Sesamina, 3, 5, 6, 12-tetrahidroxi-ergosteno-25, 3, 5, 6-triidroxi-ergosteno-25, Pentadecano, Hexadecano, Oleamida, Metilpiperitol, Ácido Betulínico, Ácido Betulínico, Ácido Oleanólico, Ácido Ursólico). Estos compuestos presentaron inhibición bacteriana frente a *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*; con un porcentaje del 90% de efectividad (Falcão; 2003; Maguna *et al.*, 2006). En otros estudios se mostro que el aceite esencial de *Hyptis suaveolens*, presenta 24 compuestos tales como: (α -Thujene, con conc (0.8), β -Carene (1.1), α -Pinene(2.5), - β Pineno (11.7), β -Myrcene (5.3), 1,8-Cineolo (44.4), Linalool(1.7), Camphor (1.1), Campheno (5.7), Terpinen-4-ol(2.2), α -Cubebene (0.3), β -Gurjunene(1.6), β -Elemeno (1.2), β -Caryophylleno (10.0), α -Farnesene (2.8), β -Selinene (0.9), Longifoleno (0.4), γ -Humuleno (0.5), α -Copaene(0.6), γ -Codineno (0.3), α -Bergamoteno (1.7), Unidentified (1.6), Unidentified (0.8), Unidentified (0.7)), perteneciente a los terpenos; entre sesquiterpenos, monoterpenos; atribuyendo que el aceite de esta especie al tener estos compuestos, desencadeno la inhibición de bacteriana y hongos (*Fusarium oxysporum*) en un 100%; la presente investigación también se atribuiría que al poseer estos compuestos y utilizar la metodología Kirby-Bauer, se obtuvo resultados para *S. aureus* en un 50% de inhibición (Tripathi *et al.*, 2008).

En los resultados obtenidos mediante microdilución y la prueba de Kirby-Bauer, mostraron ser técnicas aptas para evaluar la cepas *S. aureus* y *K. pneumoniae*, con concentraciones del aceite 0.1% al 0.05 %, al 0.01 %, hidrolato aunque se encontraron diferencias entre las actividades del aceite y las del hidrolato. para el caso de *K. pneumoniae*, en la microdilución respondieron diferente puesto que fue resistente a las concentraciones al 0.1%, al hidrolato al 0.5% y medianamente resistente al aceite al 0.05%, respecto a los valores dados por el hidrolato se puede explicar porque es un compuesto que participa como vehículo de dilución al aceite esencial y además por la participación de otros compuestos tales como: terpenos sesquiterpenos, monoterpenos entre otros (Núñez, 2008), cabe destacar que *K. pneumoniae* reporta mejores resultados cuando es evaluada en concentraciones tratadas en microdilución y a menores concentraciones del compuesto a evaluar; esto se podría atribuir que el aceite estaba disuelto en etanol 96%, donde estudios reportan que este compuesto disuelve los polisacáridos, por tanto es probable que a esto se deba la pérdida de resistencia gradual observada a medida que disminuye la concentración del aceite, la bacteria se vuelve vulnerable, donde la cápsula se disuelve y los componentes del aceite pueden ingresar al citoplasma celular. Aquí se estaría aplicando el estudio hecho por: Prindle y Wrigthy, 1997, donde afirman que el modo de acción de los compuesto fenólicos era dependiente de la concentración, a bajas

concentraciones afectaban la actividad enzimática relacionada con la producción de energía. Para el caso del hidrolato, la bacteria fue resistente ya que la cápsula funciona como una barrera que impide el paso de solutos (Edwards y Ewing, 1986; Prindle y Wrigthy, 1997).

El rango de variabilidad de los resultados en el estudio depende de diversos factores, entre estos podemos citar el método del medio de cultivo es un factor importante en el ensayo de actividad, dado que sus constituyentes pueden reaccionar con los aceites esenciales, activándolos o inactivándolos. Asimismo existen varios factores que influyen sobre los resultados tales como: el volumen del inóculo, PH y tipo de medio de cultivo, la concentración y edad del inóculo, las condiciones de incubación, lo que puede proporcionar una interpretación errónea de los resultados negativos, por otro lado, las concentraciones que no presentaron efecto antibacterial en los métodos de evaluación, pudieron presentarse bajo otras condiciones de prueba y con diferentes solventes, etc. (Mirasierra, 2006; Cox *et al.*, 1998; Kinghorn, 1994). Algunas propiedades biológicas de las plantas pueden alterar la cantidad de compuestos activos, ya que estos pueden variar según las etapas de desarrollo. Thomson en 1989 mencionó que con frecuencia la floración coincide con un incremento en el contenido de estos compuestos, así como la temporada de lluvias que pueden ocasionar una disolución de los compuestos por lo que se puede encontrar en menor cantidad, lo cual trae como consecuencia que la planta colectada no inhibiera la misma actividad Biológica, como en otras investigaciones que fueron utilizada plantas del mismo genero (Falcão, 2003), de manera que es importante considerar de interés el ambiente natural de una planta así como su localización de la misma (Falcão, 2003), también los terpenos afectan negativamente la realización de los ensayos por su baja solubilidad en los medios de cultivo, lo cual nos lleva a considerar si el gradiente de concentración que se produce alrededor del disco es uniforme o la turbidez de la microdilución, entre otras cosas (Mirasierra, 2006; Cox *et al.*, 1998) lo que encadenaría a los resultados obtenidos en los experimentos de esta investigación.

En otras investigaciones se atribuye en gran medida que las bacterias expuestas a los terpenos presentan sensibilidad (Cox *et al.*, 1998); siendo compuestos fundamentales en la mayoría de los casos, que han sido utilizados para ser evaluados frente a bacterias de importancia clínica como: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Streptococcus mutans* (Cox *et al.*, 1998; Centro de Estudios Mirasierra; 2006; Falcão; 2003; Maguna *et al.*, 2006), en esta investigación se atribuyen a los resultados obtenidos a los terpenos como: los sesquiterpenos, monoterpenos compuestos que se encontraron en el aceite esencial de *Hyptis melissoides*, lectura determinada por Cromatografía de Gases

/Espectrometría de Masas (CG/EM), estudios anteriores demuestran, que poseen actividad antimicrobiana (Maguna *et al.*, 2006; Falcão, 2003), de manera que se podría inferir que los compuestos de mayor concentración tales como: Germacreno-D, con una concentración de (29.309) Bicyclogermacreno (9.033), (tabla 3), pertenecientes a los sesquiterpenos, podrían ser los responsables del efecto antibacterial de nuestra investigación.

De igual manera, se encontró que el citral, compuesto perteneciente a los terpenos fue evaluado frente a la bacteria *Escherichia coli*, causando múltiples consecuencias con: Perforación en la membrana citoplasmática, disminución de proteínas, alteración de la entrada de iones, lo que se asume que esto conllevo a la muerte celular (Somolinos *et al.*, 2009). La actividad antimicrobiana de los terpenos, se basa en el deterioro de varios sistemas enzimáticos, incluidos aquellos involucrados en la producción de energía y de componentes estructurales. Una vez que los compuestos de los terpenos cruzan la membrana celular, puede interactuar con las enzimas y las proteínas causando un flujo contrario de protones a través de ella, afectando así a la actividad celular, posteriormente causando la muerte bacteriana (Coner, 1993; Park *et al.*, 2009; Shane *et al.*, 1979; Ilkka *et al.*, 1998; Popova *et al.*, 2009), Se encontró que el modo de acción de los compuesto fenólicos era dependiente de la concentración, a bajas concentraciones afectan la actividad enzimática relacionada con la producción de energía, mientras que altas concentraciones causan la precipitación de las proteínas (Prindle y wrighty, 1997); en otras investigaciones señalan que la relación exacta causa-efecto del modo de acción de los compuestos fenólicos no se ha determinado; pero que esto debe inactivar enzimas esenciales que reaccionan con la membrana celular o alterar la funcionalidad del material genético (Davidson, 2003); también las plantas contienen proteínas membranas perturbadoras llamadas defensinas, las cuales las protegen de infecciones microbianas (Board y Gould, 1991). La acción inhibitoria de esta proteína y péptidos antimicrobianos se debe al rompimiento de la membrana; sin embargo su modo de acción no es reconocido (Brul y Coote, 1999). Se asumiría que disrupción de la membrana celular bacteriana se da mediante 3 posibles vías: aumentando la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, afectando la estabilidad estructural de la membrana y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica, cualquiera de estos 3 efectos produce la muerte en la célula bacteriana. Un ejemplo lo presenta el aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) que se ha encontrado que causa la filtración de iones K⁺ en la membrana de la *Escherichia coli* con lo cual estimula su autólisis. (Cox *et al.*, 1998; Centro de Estudios Mlrasierra; 2006; Falcão; 2003; Maguna *et al.*, 2006)

La actividad antimicrobiana de hierbas y plantas es generalmente atribuida a la presencia de derivados fenólicos simples y complejos (Cumarinas, flavonoides, lignina, y taninos), presentes en sus extractos y aceites esenciales como es el caso del eugenol y el timol (Sofos, 1998), pueden actuar a dos niveles, sobre la integridad de la pared celular y membrana citoplasmática así como sobre la respuesta fisiológica de los microorganismos. En hongos, los compuestos fenólicos pueden desnaturalizar a las enzimas responsables del inicio de la germinación de las esporas o interferir con el uso de los aminoácidos necesarios para realizar el proceso de germinación (Nichas y Tassou, 1995).

Cabe aclarar que hay pocos estudios enfocados a comprender el mecanismo involucrado en la inhibición microbiana por especies y sus aceites esenciales (Davidson, 1996). Sin embargo se supone dada la estructura fenólica de mucho de los compuestos con actividad antimicrobiana presente en las especies y sus aceites esenciales, el modo de la acción debe ser similar al de otros compuestos fenólicos (Davidson, 2003).

Como punto final de discusión podemos confirmar la hipótesis propuesta al inicio de esta investigación, al demostrar que el aceite de *Hyptis melissoides*, tiene efecto antibacterial frente a *S. aureus*, *K. pneumoniae*

6. CONCLUSIONES

Mediante las técnicas de destilación por arrastre con vapor y extracción continua utilizando como disolvente agua destilada, se obtuvo un rendimiento de 0.22 por ciento v/p en la extracción de aceite esencial de *Hyptis melissoides*.

El análisis del aceite esencial de *Hyptis melissoides* evidenció la riqueza de la planta en sesquiterpenos, fenoles, monoterpenos, éteres cíclicos y ésteres, entre los cuales los más representativos fueron **GERMACRENE-D**, con una concentración de 29.3 % y **BICYCLOGERMACRENE** con una concentración de 9.033 %.

Con base en los resultados obtenidos mediante antibiograma, parece que la bacteria gram positiva *Staphylococcus aureus* fué más sensible a la acción del aceite presentando un porcentaje inhibitorio de 49.6%, comparado con la gram negativa *klebsiella. pneumoniae*, que presentó un porcentaje inhibitorio de 43.2%. Sin embargo, estas diferencias estadísticamente no fueron significativas.

Con base en los resultados obtenidos mediante ensayos de microdilución si hubo diferencias significativas entre las respuestas a los tratamientos dependiendo del tipo de bacteria. Como pudo observarse, todos los tratamientos (excepto control+) detuvieron el crecimiento de *S. aureus* en medio líquido. Mientras que *K. pneumoniae* fue resistente al aceite al 0.1%, al hidrolato al 0.5% y medianamente resistente al aceite al 0.05%.

El etanol utilizado como diluyente del aceite ocasiono un porcentaje de inhibición igual al 20% en antibigramas.

El aceite de *Hyptis melissoides* es un compuesto denso inmiscible en solventes polares, propiedad que probablemente influyo en la obtención de una mezcla homogénea en ensayos de microdilucion y en la obtención de resultados confiables.

El aceite esencial de *Hyptis melissoides* puede ser una fuente importante de sustancias con alta actividad antibacteriana que podría usarse en preparaciones farmacéuticas para el tratamiento de infecciones causadas por estos microorganismos. Por otra parte, este es el primer reporte de actividad antibacteriana del aceite esencial de *Hyptis melissoides* contra patógenos causantes de neumonía y de otros procesos infecciosos de importancia a nivel de la Salud humana.

7. RECOMENDACIONES

Siendo *Hyptis melissoides* una planta que está en amenaza de extinción sería recomendable, hacer trabajos de campo tanto en la cuenca del Patía, en la ensillada (Nariño) como en las estribaciones del desierto de la Tatacoa para caracterizar con detalle el hábitat de esta planta. Debido al interés general que presentan estos pequeños enclaves áridos interandinos, cualquier medida que se tome encaminada a la protección de algunos sectores beneficiaría a varias especies raras que confluyen en dichos ambientes, como es el caso de *Hyptis melissoides*. (Fernández y Rivera, 2006).

Puesto que este trabajo se desarrolló con el aceite *Hyptis melissoides* con todos sus 59 compuestos queda la duda de cual de ellos es el que tiene mayor actividad antibacteriana, o cual es el aporte de cada uno de ellos. Sería importante, en estudios posteriores separar los compuestos para evaluar la actividad biológica de cada uno de ellos.

Para próximas investigaciones se podría evaluar el extracto de *Hyptis melissoides*, puesto que en esta investigación no se realizó. Sería interesante conocer su efectividad, ya que cuando se trabaja con extracto se tiene otros compuestos importantes como son los flavonoides.

Con base en nuestros resultados y en trabajos de investigación reportados en literatura. Se recomienda realizar solo pruebas de antibiograma para evaluar la actividad biológica de aceite esencial debido a su naturaleza no polar.

8. BIBLIOGRAFIA

- Afriditi, S.; eleni, P.; Constantita, N.; Stella, K.; Thomas, I.; Minas, A. 1996. "Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Origanum Essential Oils"; *J. Agric. Food Chem.* 44, 1202-1205.
- Almtorp, G. T.; Hazell, A C.; Torrsell, K. B. 1991. lignan and pyrone and other constituents from *Hyptis capitata*. *Phytochemistry*, 30(8); 2756.
- Aycard, J. P.; Klini, F.; Kam, B.; GaydoU, E. M.; Faure, R. 1993. Isolation and identification of spicigera lactone: complete proton and carbon-13 assignments using twodimensional NMR experiments. *Journal of Natural Products*, 56(7); 1173.
- Azevedo, N. R.; Campos, I. F .; Ferreira, H. D.; Portes, T. A.; Santos, S. C.; Seraphin, J. C.; Paula, J. R.; Ferri, P. H. 2001. Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Phytochemistry*, 57(5), 733-736.
- Bailac, P.; Duschatzky, C.; Ponzi, M.; Firpo, N. 1999. Essential oil of *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. grown in San Luis, Argentina. *J. Essent. Oil Res.*, 11(2); 217-219.
- IAvH. 2003. *Estudio del Mercado Colombiano de aceites esenciales*. Instituto de investigación de recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogota, Colombia. 109 p
- Barbosa, p. p. y Barbosa, C. P. 1992. Studies on the antiulcerogenic activity of the esencial oil of *Hyptis mutabilis* Briq. in rats. *Phytotherapy Research*, 6(2); 114-15.
- Bispo, M.D.; Mourao, R.H.; Franzotti, E.M.; Bomfim ,K.B.; Arrigoni-Blank, M.F.; Moreno, M.P.; Marchioro, M.; Antonioli, A.R. 2001. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. *J Ethnopharmacol.* 76(1):81-86.
- Beuchat, L.; R. 2001. Control of foodborne pathogens and spoilage microorganisms by naturally occurring antimicrobials. En: *Microbial Food Contamination*. Wilson CL, S Droby. (Ed.). CRC Press. London, UK. Chap. 11: 149-169.
- Brako, L. y Zarucchi, J. L. 1993. Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru. *Syst. Bot. Monogr.* 45. Missouri Botanical Garden. Pag.1286p.

- Brum, L.F.; Elisabetsky, E.; Souza, D. 2001. *Effects of linalool on Glutamate Release and Uptake in mouse cortical Synaptosomes*. *Neurochemical Research*; 26 (3);191-194.
- Brock, T. D. 1978. Capitulo 2, la célula procariota, 15-60 p., En: *Biología de los Microorganismos*, 2 edición, Ediciones omega, S.A., Barcelona, 774p.
- Brock, N. R.; Harper, S. J.; Waller, J. R.; Nicholson, M. L. 2005. A consecutive series of 70 laparoscopic donor nephrectomies demonstrates the safety of this new operation. En: *Transplantation Proceedings*, 37, (2); 627-628.
- Brophy, J. J.; Goldsack, R. J.; Copeland, L. M.; Palá-Paúl. J. 2002. Essential oil of *Eryngium* L. species from New South Wales (Australia). *Journal of Essential Oil Research*, (en prensa).
- Brophy, J. J.; Lassak, E. V. 1987. The volatile leaf oils of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. and *Vitex trifolia* L. var. *bicolor* (Willd.) Moldenke from Fiji. *Flavour Fragrance J.*, 2(1); 41-3.
- Board, R. G.; y Gould, G.W. 1991. Future Prospects, in *Food Preservatives*. Glasgow and London: Blackie Academic. And Profesional, 267-283pp.
- Brul, S.; Y Coote, P. 1999. Preservative agents in Foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 1-17
- Callejas, M. S. 2009. Relación entre enfermedad Periodontal y Neumonía post Operatoria. segunda fase. Guatemala; 1-31pp
- Castañeda, M.; Muñoz, A.; Martínez, J.; Stashenko, E. 2007. Estudios de la Composición Química y la actividad Biológica de los Aceites Esenciales de diez Plantas Aromáticas Colombianas. *Scientia et Technica*, 13 (33);165-166.
- Cifuentes, M. C.; Gutierrez, E. C.; Albares, J. M.; Rios, J. A.; Angel, L. S.; Morales, D.R. 2010. Estudio Farmacognóstico para el cuidado de la salud a partir de aceites esenciales obtenidos por destilación; Fundación Universitaria del Área Andina Seccional Pereira. *INVESTIGACION ES ANDINA*. 12 (12); 12- 100.
- Cook, N.C.; y Samman, S. 1996. Flavonoids Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effects, And Dietary Sources. *Nutr. Biochem.* 7: 66-76. Convenio Andrés Bello, "270 Plantas Medicinales Iberoamericanas". 182-184pp.
- Coner, D.E. 1993. Naturally Curing Compounds. In P. Davidson y A. L. Brance (EDS), *Antimicrobials in foods*. New York: Marcel Dekker, inc. 441-446pp

Cox, S.; Gustafson, J.; Mann, C., Markham, J.; Llew, Y.; Hartland, R.; Bell, H.; Warmington, J.; Wyllei, S. 1998. "Tea Tree Oil causes K⁺ Leakage and Inhibition Respiration in *Escherichia coli*". *Letters in Applied Microbiology*, 26, 355-358.

Corporación para la Investigación y Desarrollo Agropecuario. 2006. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas – sinchi. Preparación, conservación y manejo de purines e hidrolatos. 1-8pp.

Cerpa, M. G. 2007. Hidrodestilación de Aceites Esenciales: Modelado y Caracterización. Tesis Doctoral, Univ. Valladolid (UVa). Difusión: <http://hydrodistiller.110mb.com/presentacion.html>

Dewick, P. M. 1997. Medicinal natural products. A biosynthetic approach. John Wiley & sons; Chap. (5): 152-213pp.

Davidson, P. M y Zivanovic, S. 2003. The use of natural antimicrobials. En: Food Preservation Techniques. Zeuthen P, L Bogh-Sorensen. (Ed.). Washington, D.C., USA. Chap. (2): 5-29pp.

Davidson, P. M y Branen, A.L. 1993. Antimicrobials in Foods Marcel Dekker Inc., New York.

Davidson, P. M. 1996. Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds. *Microbiology-Fundamentals and Frontiers*. Washington.DC: ASM. Press: 530-556pp.

Falcão, D. Q. 2003. Estudo Químico e Farmacológico de Quatro Espécies de *Hyptis*. Tesis Doctoral, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Centro de Ciências da Saúde. Faculdade de Farmácia. do Estado do Rio Grande do Sul. Rio de Janeiro. FF/UFRJ. 1-178pp.

Falcão, D. Q.; Fernandez-Alonso, S. B.; Menezes, F. S. 2003. Triterpenos de *Hyptis fasciculata* Benth. *Rev Bras Farmacogn* 13 (Supl.): 81-83.

Fernández- Alonso, J. L. y Rivera-Díaz, O. 2006. Labiatae. pp. 385-582, in: G. Galeano y N. García (eds.): *Libro Rojo de Plantas de Colombia*. Volumen 3. Serie Libros Rojos de especies amenazadas de Colombia. Instituto Alexander von Humboldt – Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Bogotá.

Fernández-Alonso, J.L.; Vega., Filgueira, J.J.; Pérez. G. 2003. Lectin prospecting in Colombian Labiatae. A systematic-ecological approach. *Biochem. System. Ecol.* (31): 617-633.

- Fernández-Alonso, J. L. 1998. Estudios en *Salvia* (Labiatae) de Colombia. Resúmenes VII Congreso Latinoamericano de Botánica. Ciudad de México. 296p.
- Figueroa, R. I y Carbajal, G. T. 2000. Actividad Antibacteriana in vitro de la grindelia Boliviana Rusby (chiri chiri) en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, 1-11pp.
- Fragoso, M.; Gonzalez-Chimeo, E.; Pereda-Miranda, R. 1999. Novel Labdane Diterpenes from the Insecticidal Plant *Hyptis spicigera*. *Journal of Natural Products*, 62(1); 45-50.
- Fragoso, M.; Gibbons, S.; Mpereda, R. 2005. Antistaphylococcal and cytotoxic compounds from *Hyptis pectinata*. *Planta Med*, (71): 278-80.
- Gutiérrez, M.C. 2002. Identificación de compuestos volátiles por CG-MS, Boletín Intexter (U.P.C.). 122; 1-7pp
- Gupta, M.P.; Monge, A.; Karikas, G.A.; Lopez de Cerain, A.; Solis, P.N.; Leon, E.; Trujillo, M.; Suarez, O.; Willson, F. 1996. Screening of Panamanian medicinal plants for brine shrimp toxicity, crown gall tumor inhibition, cytotoxicity and DNA intercalation. *Int. J. Pharmacogn.*, 34 (1); 19-27.
- Hac, L. V.; Khoi, T. T.; Dung, N. X.; Mardarowicz, M.; Leclercq, P. A. 1996. A new chemotype of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. from the Nghe An Province, Vietnam. *J. Essent. Oil Res.*, 8(3); 315-318.
- Helander, I.; Alakoml, H.; Lavta-Kala, K.; Mattila-Sandholm, T.; Pol, I.; Smid, E.; Gorris, L. ; Wright, A. 1998. "Characterization of the Action of selected Essential Oil Components on Gram-negative Bacteria"; *Journal Agricultural Food Chemistry*, 46, 3590-3595.
- Henrique, D.M.; José, G.M.; Costa, E. O.; José, P. 2010. Additive effects of *Hyptis martiusii* Benth with aminoglycosides against *Escherichia coll*. *Indian J Med Res* 131, 106-108pp
- Ilkka, M. H.; HannA, A.; Kyosti, Latva-Kala.; Tlina, Mattila-Sandholm., Eddy J.S.; Leon G. M. 1998. Gorris, and Atte von Wright.. "Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria", *J. Agric. Food Chem.* 46; 3590-3595.
- Isobe, T.; Doe, M.; Morimoto, Y.; Nagata, K.; Ohsaki, A. 2006. The anti-*Helicobacter pylori* flavones in a Brazilian plant, *Hyptis fasciculata*, and the activity of methoxyflavones. *Biol Pharm Bull*; 29: 1039-41

- Jain, S. R.; Jain, P. R.; Jain, M. R. 1974. Antibacterial evaluation of some indigenous volatile oils. *Planta Med.*, 26(2); 196-199.
- Jogersen, P. M. y León-Yañez, S. 1999. Catálogo de las plantas vasculares del Ecuador. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 75: 1-1181.
- Kunth, C. S. 1818. Labiatae. In Humboldt, Bonpland & Kunth, *Nova Genera et Species Plantarum* 2, Paris.
- Kinghorn, A.; D. 1994. The Discovery of natural plants with therapeutic potential. *IN Gullo, v.p. (ed). The Discovery of natural products with therapeutic potential.* Butterworth-Heinemann pres. Kenilworth, New Jersey. 81-108pp
- Kar, A. Y Jain, S.R. 1971. Antibacterial Evaluation of Some Indigenous Medicinal Volatile oils; *Department of Pharmaceutical Sciences, University of Saugar, Saugar, M. P., India, Qual Plant. Mater. Veg.* 20 (3); 231-237
- Khunt, M.; Rimpler, H.; Heinrich, M. 1994. Lignans and other compounds from the Mixe Indian medicinal plant *Hyptis verticillata*. *Phytochemistry*, 36(2); 4859.
- Lee, K. H.; Lin, Y. M.; Wu, T. S.; Zhang, C.; Yamagishi, T.; Hayashi, T.; Hall, I. H.; Chang, J. J.; Wu, R. Y.; Yang, T. H. 1988. Antitumor agents. LXXXVIII. The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens*, and *Hyptis capitata*: ursolic acid and related derivatives. *Planta Med.*, 54(4); 308-11.
- Lin, Y. L.; Lee, H. P.; Huang, R. L.; Ou, J. C.; Kuo, Y. H. 1993. *Studies on the constituents of Hyptis rhomboides*. *Zhonghua Yaoxue Zazhi*, 45(1); 61-8.
- Ilkka, M. H.; Hannu-Leena, A.; Kyosti, Latva-Kala.; Tlina, Mattila-Sandholm., Eddy J.S.; Leon G. M. 1998. Gorris, and Atte von Wright.. "Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria", *J. Agric. Food Chem.* 46; 3590-3595.
- Isobe, T.; Doe, M.; Morimoto, Y.; Nagata, K.; Ohsaki, A. 2006. The anti-*Helicobacter pylori* flavones in a Brazilian plant, *Hyptis fasciculata*, and the activity of methoxyflavones. *Biol Pharm. Bull.* 29: 1039-1041.
- Lu, Y.; Zhao, Y.P.; Wang, Z.C.; Chen, S.Y.; Fu, C.X. 2007. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Actinidia macrosperma* from China. *Nat. Prod. Res.* 2007; 21 : 227-33.

Martínez, A. 2003. Aceites esenciales. Facultad Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín. 34p.

Mamani, E.; Luján, D.; Pajuelo, G. 2006. Perfil de sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus*. Experiencia en el Hospital Nacional Hipólito U nanue. En: Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 67(2); 120-124.

Maguna, F.P.; Romero, A.M.; Garro, O.; Okulik, N.B. 2006. Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides; Universidad Nacional Nordeste; Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de Argentina.1-4pp

Martinez, M. 1959. Plantas útiles de la flora mexicana. Ediciones Botas, México.

Martin, B.; Ngassoum, H.; Ousmaila, T.; Ngamo, M.; Maponmetsem, L.J.; Gerhard, B. 2004. Aroma compounds of essential oils of two varieties of the spice plant *Ocimum canum* Sims from northern Cameroon. *Journal of Food Composition and Analysis*. 17 (2); 197-204.

Malan, K.; Pelissier, Y.; Marion, C. 1988. The essential oil of *Hyptis pectinata*. *Planta Med* 54(6):531–532.

Mbwambo, Z. H.; Moshl, M. J.; Masimba, P. J.; Kapingu, M.C.; Nondo, R.S. 2001. Antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of extracts of *Terminalia brownii* roots and stem. *BMG Gompment Altern Med*.7:9.

Maguna, F. P.; Romero, A. M.; Garro, O. A.; Okulik, N. B. 2006. Actividad antimicrobiana de un grupo de terpenoides. Resumen: E-057. Universidad Nacional del Nordeste comunicaciones científicas y tecnológicas. 1-4pp.

Melo, G. B.; Silva, R.L.; Melo, V. A.; Lima, S. O.; Antonilli, R.; Castro-E-Silva, T.; Marcassa, L. G.; Bagnato, V. S.; Zucoloto, S.; Ramalho, L. N.; Ramalho, F.; Castro-E-Silva, O. 2005. Enhancement of Liver Regeneration by the Association of *Hyptis pectinata* with Laser Therapy; *Digestive Diseases and Sciences*, 50, (5); 949–954.

Menghini, A.; Mantilacci, G.; Pocceschi, N.; Tatani, N. C. 1996. *Composition and in vitro antifungal activity of the essential oil of Hyptis Suaveolens Poit. from Cameroun*. *EPPOS*, 7, 435-440. 1996.

Mesa, A.C.; Bueno, J.G.; Betancur, L. A. 2004. Productos naturales con actividad antimicótica. *Rev. Esp.Quimioterap*. 17(4): 325-31.

Misra, T. N.; Singh, R. S.; Ojha, T. N.; Upadhyay, J. 1981. Chemical constituents of *Hyptis suaveolens*. Part I. Spectral and biological studies on a triterpene acid. *Journal of Natural Products*, 44(6); 735-38.

Murillo, E.; Fernández, K.; Sierra, D.; viña, A. 2004. *Caracterización fisicoquímica del aceite esencial de albahaca*. II. Revista Colombiana de Química. 33 (2);139-148.

Mukherjee, K. S.; Mukherjee, R. K.; Ghosh, P. K. 1984. *Chemistry of Hyptis suaveolens: a pentacyclic triterpene*. *Journal of Natural Products*, 47(2); 377-8. 1984.

Man, L.; Li-Ke, J.; Yao-Xlong, H.; Ming, X.; Guo-lin, Z. 2004. Effects of Citral on *Aspergillus flavus* Spores by Quasi-elastic Light Scattering and Multiplex Microanalysis Techniques. *Fudan University, Shanghai, Chin* 36(4): 277–283.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 17: 234-8.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999. NCCLS document M100-59. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. 9th. Informational supplement. NCCLS, Wayne Pa .

National Committee Clinical Laboratory Standards. 2003. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility test, 8th ed. Approved standard M2-A8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne PA.

Nichas, G. J. y Tassou, C.C. 1996. Growth/survival of *salmonella enteritidis* on fresh poultry and fish under vacuum or modified atmosphere. *Lett. Appl. Microbiol.* 23: 115-279

Núñez, C. E. 2008. *Solventes y solubilidades de Sustancias Orgánicas*. *cenunez.com.a*, 1-10pp.

Novelo, M.; Cruz, J. G.; Hernandez, L.; Pereda-Miranda, R.; Chai, H.; Mar, W.; Pezzuto, J. M. 1993. Chemical studies on Mexican *Hyptis* species. VI. Biologically active natural products from Mexican medicinal plants. II. Cytotoxic constituents from *Hyptis verticillata*. *Journal of Natural Products*, 56(10); 1728-36.

Onayade, O. A.; Looman, A.; Scheffer, J. C.; Svendsen, A. B. 1990. Composition of the herb essential oil of *Hyptis spicigera* Lam. *Flavour Fragrance Journal*, 5(2); 101-5.

Panuwat, S.; Joseph, M.; Kees, S.; Stephen, W. 2003. "Antimicrobial Properties of Basil and Its Possible Application in Food Packaging"; *J. Agric. Food Chem.* 51; 3197-3207.

Park, M.J.; Gwak, K.S.; Yang, A.I.; Klm, K. W.; Jeung, E.B.; Chang, J.W.; Choi, I.G. 2009. Effect of citral, eugenol, nerolidol and α -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*; 1-7pp

Pérez, G.; vega , N.; Fernández-Alonso, J.L. 2006. Lectin prospecting in Colombian Labiatae. A systematic-ecological approach– II. *Caldasia* 28: 179-196.

Pérez-Alonso, M. J.; Velasco-Negueruela, A.; Palá-Paúl, J.; Ramos-Vazquez, P., Pérez de Paz, P.L.; García, M. C. 1999. Volatile constituents from the fruits of *Astydamia latifolia* (L. fil.) Baillon grown in the Canary Islands. *Journal of Essential Oil Research*, 11;403-405.

Pereda-Miranda, R.; Hernandez, L.; Villavicencio, M. J.; Novelo, M.; Ibarra, P.; Chai, H.; Pezzuto, J. M. 1993. Structure and stereochemistry of pectinolides A-C, novel antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihydro-a- pyrones from *Hyptis pectinata*. *Journal of Natural Products*, 56(4), 583-93.

Pereda-Miranda, R.; Fragoso-Serrano, M.; Cerda-Garcia-Rojas, C. 2001. Application of molecular mechanics in the total stereochemical elucidation of spicigerolide, a cytotoxic 6-tetraacetyl-oxyheptenyl-5, 6-dihydro-a-pyrone from *Hyptis spicigera*. *Tetrahedron*, 57(1), 47-53.

Pereda-Miranda, R.; Garcia, M.; Delgado, G. 1990. Chemical studies on Mexican *Hyptis* species. Part 3. Structure and stereochemistry of four a-pyrones from *Hyptis oblongifolia*. *Phytochemistry*, 29(9); 2971-4.

Pereda-Miranda, R. Y Gascon-Figueroa, M. 1988. Chemistry of *Hyptis mutabilis*: New pentacyclic triterpenoids. *Journal of Natural Products*, 51(5); 996-8.

Pereda-Miranda, R. Y Delgado, G. 1990. Chemical studies on Mexican *Hyptis* species. Part 2. Triterpenoids and flavonoids from *Hyptis albida*. *Journal of Natural Products*, 53(1); 182- 5.

Porter, B. R.; Reese, P. B.; Williams, A. D.; Williams, D. J. 1995. Acaricidal and insecticidal activities of cadina-4,10(15)-dien-3-one. *Phytochemistry*, 40(3): 735-8.

- Popova, M. P.; Ioanna, B.; Chinou, B.; Ilko, N.; Marekov, A.; Vassya, S.; Bankova, A. 2009. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis, Division of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry, Department of Pharmacy, University of Athens, Greece, 1-10pp.
- Prescott, L. M.; Harley, J. P.; Klein, D. A. 2005. Microbiology, 5 ed., Editorial the McGraw-Hill Companies, 1147p.
- Prindle, R.F y Wright, E.S. 1977. Phenolic Compuunds. In *Disinfections. Sterilisation and preservation*. Block. S.S (ed). 219-51.
- Prashar, A.; Hili, P. B.; Robert. G.; Veness, A.; Christine , S.; Evans, A. 2003. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*, 1-7pp.
- Rashid, T. y Ebringer, A. 2006. "Ankylosing spondylitis is linked to *Klebsiella*-the evidence (Epub ahead of print)". *Clin Rheumatol* 26 (6): 858–64.
- Rao, B. G. y Adinarayana, S. 1970. Antimicrobial action of some essential oils. *Riechst., Aromen, Koerperpflagem.*, 20(6); 215-222.
- Reyes, J.A.; Patiño, J.G.; Martínez, J.R.; Stashenko, E.E. 2007. *Caracterización de los metabolitos secundarios de dos especies de Ocimum (Labiatae), en función del método de extracción*. Scientia et Technica Año III. 33; 121-123.
- Rivero-Cruz, B.; Rivero-Cruz, I.; Rodriguez, J. M.; Cerda-GARCIA-Rojas, C. M.; Mata, R. 2006 *Qualitative and quantitative analysis of the active components of the essential oil from Brickellia veronicaefolia by nuclear magnetic resonance spectroscopy*. J Nat Prod. 2006 Aug;69(8):1172-6.
- Rojas, A.; Hernandez, L.; Pereda-MIrranda, R. 1992. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 35(3):275–283.
- Romero, C.; Belisario, y Blasco, M. 2004. *Extracción del aceite esencial de albahaca (Ocimum basilicum L.) con CO2 supercrítico*. *Ciencia*. 12 (4); 309-314.
- Rojas, A.; Hernandez, L.; Pereda-Miranda, R.; Mata, R. 1992. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 35(3); 275-83.
- Rojas, L. B.; Velasco, J.; Díaz, T.; Gil-Otaiza, R.; Carmona, J.; Usubillaga, A. 2010. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, *Composición química y efecto antibacteriano del aceite esencial de Aloysia*

triphylla (L'Hér.) Britton contra patógenos genito-urinarios, ISSN (Versión impresa): 0717-7917; Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica Chile. 9, (1); 56-62pp.

Rosa, M. J.; Huerta, I. J.; Nuño, N. L.; Velázquez, O. 2006. Actividad antimicrobiana del extracto fluido de la planta *Gnaphalium spp* (gordolobo). Universidad del Valle de México. Rectoría Institucional. Dirección Institucional de Investigación e Innovación Tecnológica

Sikkema, J.; Debont, J.; Poolman, B. 1995. "Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons". Microbiological Reviews, 59; 201-222.

Simões, C.C.; Araújo, D.B.; Araújo, R.P. 2008. Estudo in vitro e ex vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. *Rev Bras Farmacogn* 18: 84-89.

Somolinos, M.; Garci, D.; Condo, S.; Mackey, B.; Pagan, R.; R. 2009. *Inactivation of Escherichia coli by citral*, Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Miguel Servet, Zaragoza, Spain, Department of Food and Nutrition Sciences, University of Reading, Whiteknights, Reading.

Sofos, J. N.; Beuchat, L.R.; Davinson, P. M.; Johnson, E. A. 1998. Naturally Occurring Antimicrobials in Food. Coanici For Agricultura Science and Technology (CAST). Ames. I A.

Shane.; Griffin. 1979. "Aspects of Antimicrobial Activity of Terpenoids and the Relationship to their Molecular Structure"; *Physic Bulletin*. 30, 262p.

Tanowitz, B. D.; Junak, S. A.; Smith, D. M. 1984. Terpenoids of *Hyptis emoryi*. *J. Nat. Prod.*, 47(4); 739-40.

Toscano, J.Y. 2006. *Traditional Use of Medicinal Plants in the Sidewalk San Isidro, Municipality of San Jose de Pare-Boyacá: A Preliminary Study Using Quantitative Technical*. Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Tunja, Boyacá, Colombia.

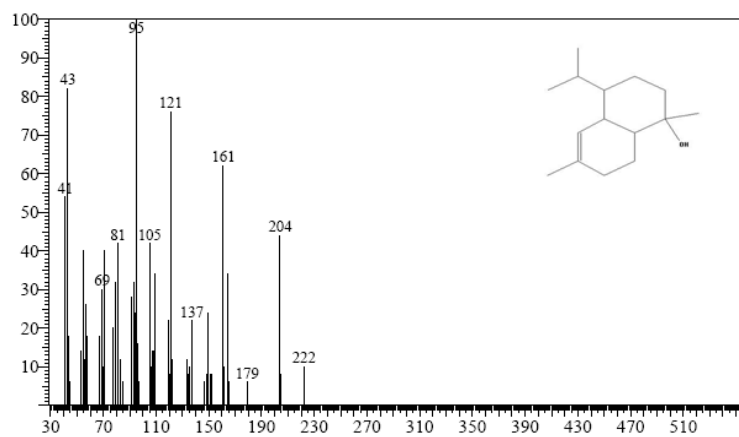
Tripathi, A.; Sharma, N.; Sharma, V. 2008. In vitro efficacy of *Hyptis suaveolens* L. (Poit.) essential oil on growth and morphogenesis, of *Fusarium oxysporum f.sp. gladioli* (Massey), 1-10pp

Viña, A.; Fernández, K.; Murillo, E.; Méndez, J. 2007 *Actividad antioxidante y antimicrobial de los volátiles de cuatro variedades de albahacas cultivadas en el departamento del Tolima*. *Scientia et Technica* Año 13(33); 401-403.

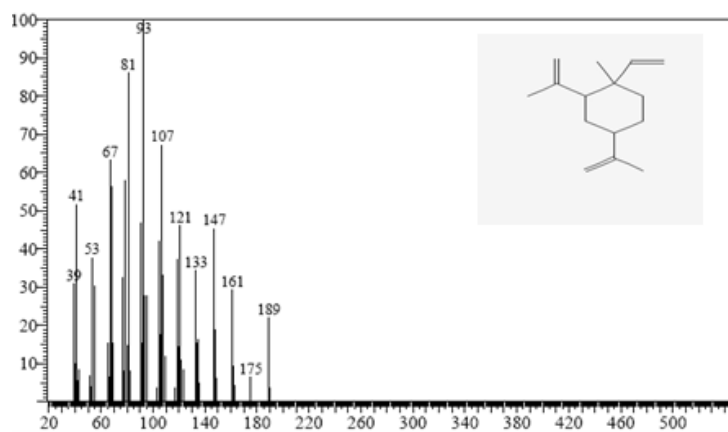
- Vergara-Santana, M.I., Bravo-Magana, F. 1992. Memorias. III. Reunión Nacional Selva baja Caducifolia. Universidad de Colima, México.
- Vega, N.; y Pérez, G. 2001. Detection and interaction of Labiatae Lectins with MCF-7 cells. Poster 15, INTERLEC 19. Fortaleza, Brasil.
- Vega, N.; y Pérez, G. 2006. Isolation and characterization of a *Salvia bogotensis* seed lectin specific for the Tn antigen. *Phytochemistry* 67: 347-355pp.
- Vega, N.; Martínez, M.; Pérez, G. 2001. Interacción de la lectina de *Salvia bogotensis* con líneas celulares. esúmenes XXXVI Congreso Nacional de Ciencias Biológicas, Cartagena.
- Vega-Carrillo, H. R.; Iskander, F. Y.; Manzanares-Acuna, E. 1997. Elemental distribution in medicinal plants commonly used in folklore medicine in Mexico. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 66(2); 95-105.
- Watson, L. y Dallwitz, M. J. 1992 onwards. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Version: 20th May 2010. <http://delta-intkey.com/>.
- Waizel-Bucay, J.; y Martínez, I. M. 2007. Plantas empleadas en odontalgias I. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F. Vol. LXIV, (5)173-186pp.
- Yamagishi, T.; Zhang, de C.; Chang, J. J.; mcphail, D. R.; Mcphail, A T.; Lee, K. H. 1988. Antitumor agents. Part 94. The cytotoxic principles of *Hyptis capitata* and the structures of the new triterpenes hyptatic acid A and B. *Phytochemistry*, 27(10); 3213-16.

ANEXOS

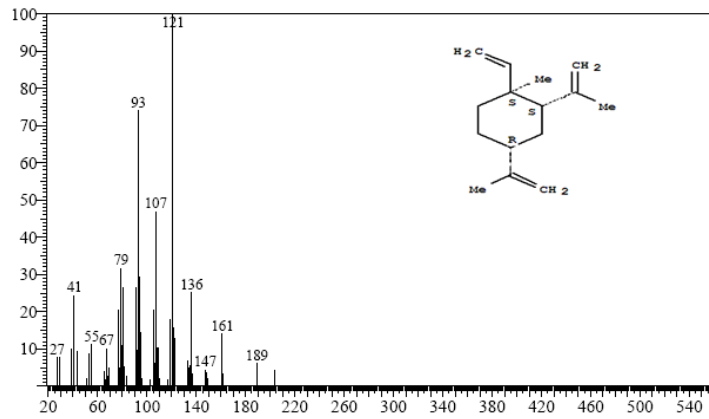
Anexo 1. Cromatografía de la estructura Alpha.-cadinol (C₁₅H₂₆O)



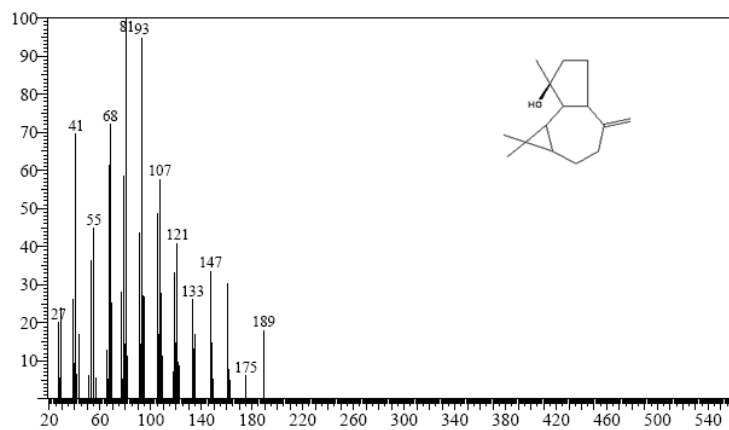
Anexo 2. Cromatografía de la estructura Beta. elemene (C₁₅H₂₄)



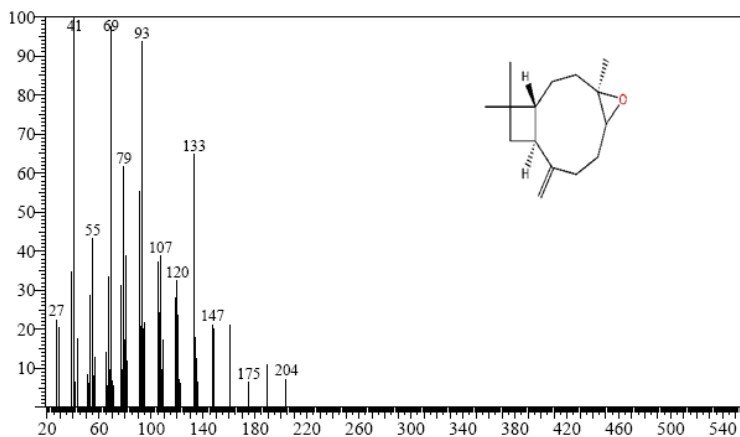
Anexo 3. Cromatografía de la Estructura cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis (1-methylethenyl) (C₁₅H₂₄)



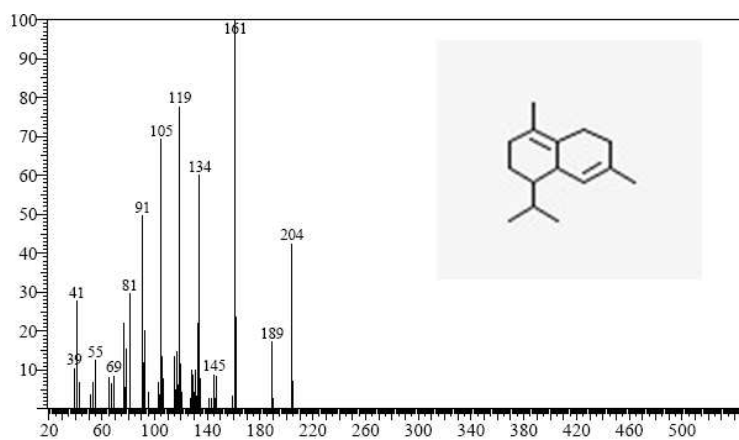
Anexo 4. Cromatografía de la estructura 1h-cycloprop [e]azulen-7-ol, decahydro-1, 1,7-trimethyl-4- (C₁₅H₂₄O)



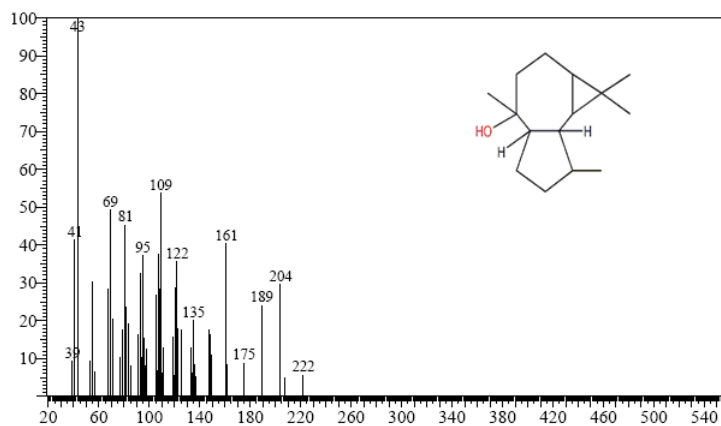
Anexo 5. Cromatografía de la estructura Caryophyllene oxide (C₁₅H₂₄)



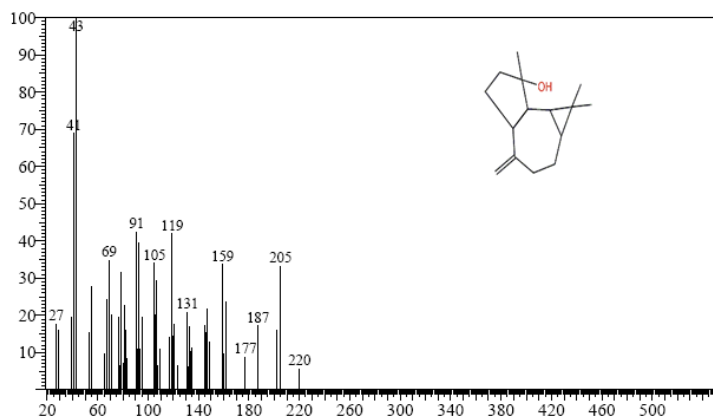
Anexo 6. Cromatografía de la estructura Delta.-cadinene (C₁₅H₂₄)



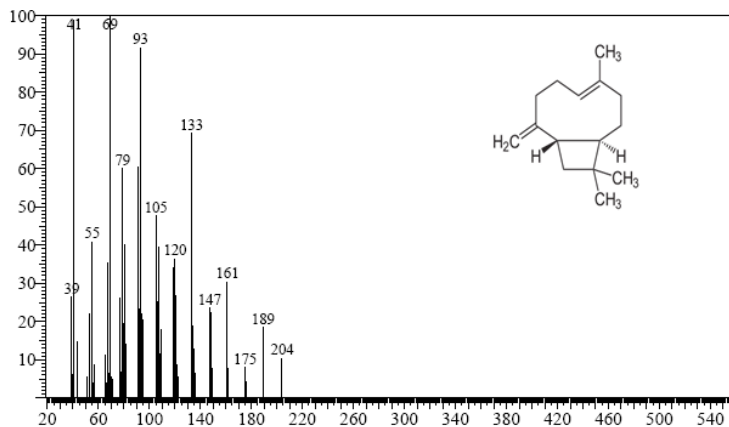
Anexo 7. Cromatografía de la estructura (-)-Globulol (C₁₅H₂₆O)



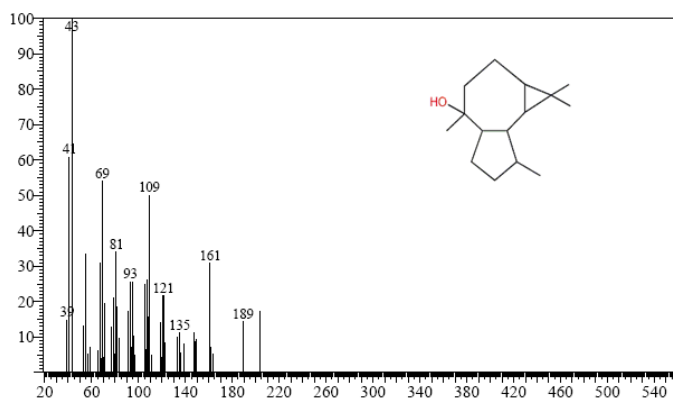
Anexo 8. Cromatografía de la estructura (-)-Spathulenol (C₁₅H₂₄O)



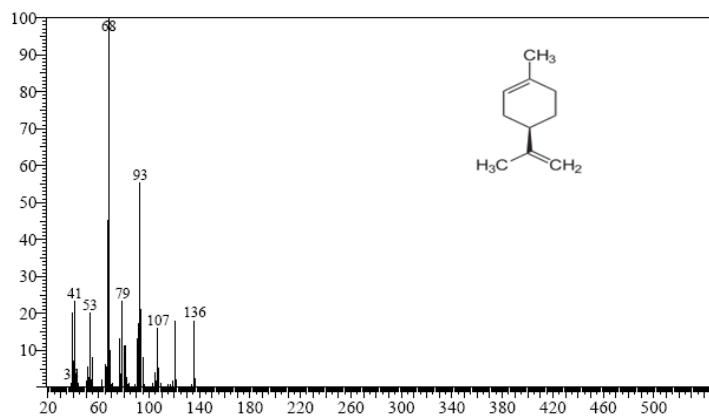
Anexo 9. Cromatografía de la estructura Trans (.beta.)-caryophyllene (C₁₅H₂₄)



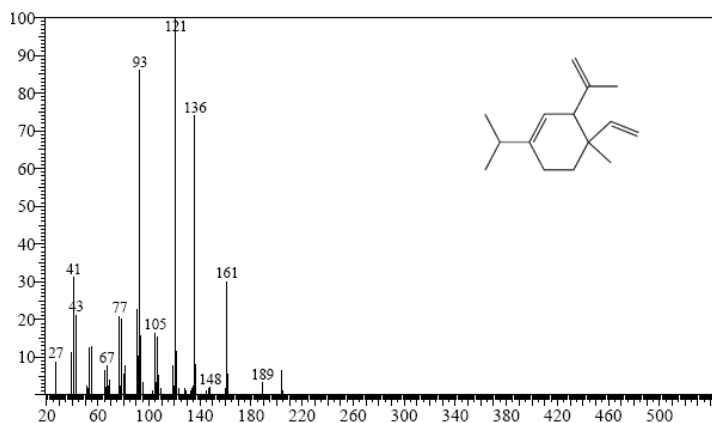
Anexo 10. Cromatografía de la estructura Veridiflorol (C₁₅H₂₆O)



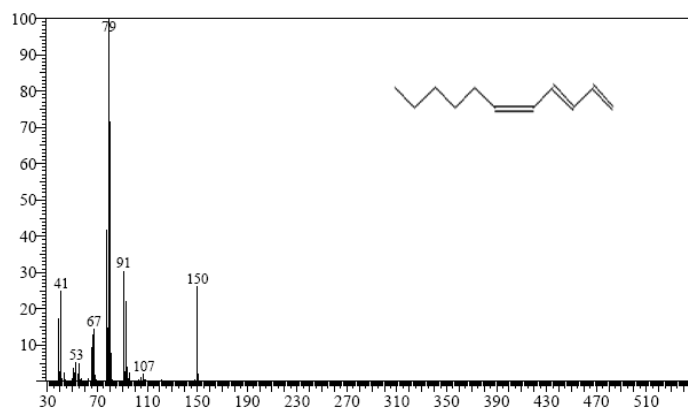
Anexo 11. Cromatografía de la estructura D-limonene (C₁₅H₁₆)



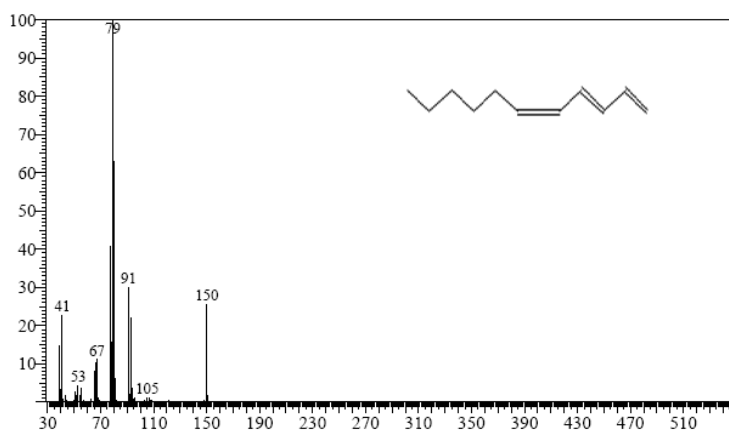
Anexo 12. Cromatografía de la estructura Delta.-elemene (C₁₅H₁₈O)



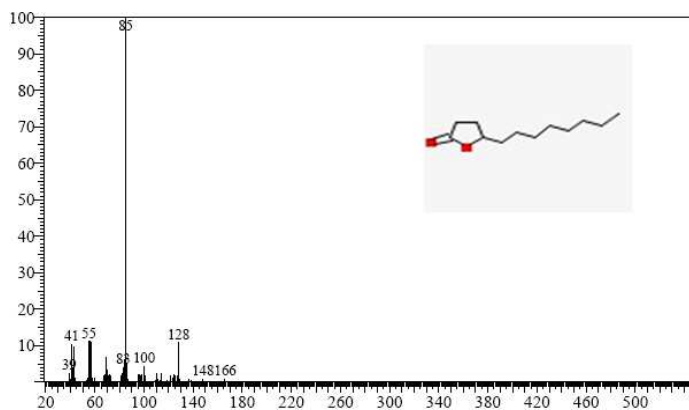
Anexo 13. Cromatografía de la estructura (3e, 5z)-1, 3,5-undecatriene (C₁₁H₁₈)



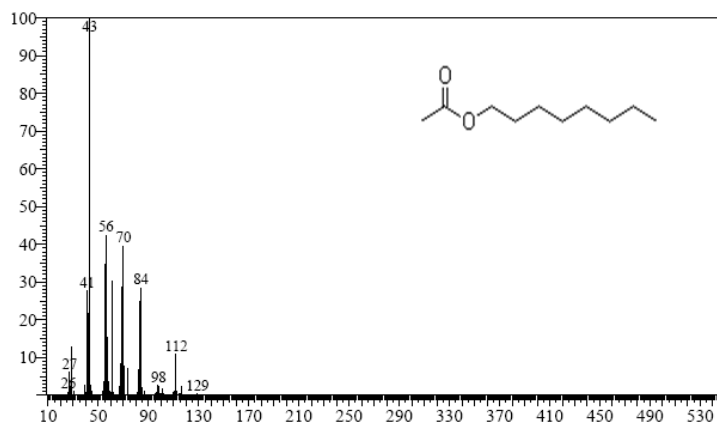
Anexo 14. Cromatografía de la estructura (E, E)-1,3,5-undecatriene (C₁₁H₁₈)



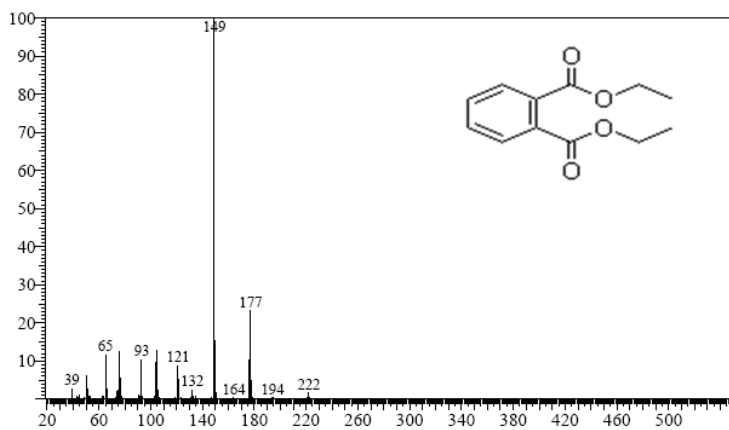
Anexo 15. Cromatografía de la estructura 4-octylbutan-4-olide (C₁₁H₂₀O₂)



Anexo 16. Cromatografía de la estructura acetic acid, octyl ester (C₁₀H₂₀O₂)



Anexo 17. Cromatografía de la estructura 1,2-benzenedicarboxylic acid, diethyl ester (C₁₅H₁₄O)



Anexo 18. Estadísticos descriptivos para las variables del experimento en Antibiograma.

Estadísticos descriptivos

Variable dependiente: D24

TIPO DE BACTERIA	CONCENTRACIÓN (CAT.)	Media	Desv. típ.	N
Staphylococcus Difusión	(0.1%)	14,333	,5000	9
	(0.05%)	15,333	,5000	9
	(0.01%)	10,000	,0000	9
	HIDROLATO (0.5%)	10,000	,0000	9
	ETANOL (96%)	5,000	,0000	9
	ANTIBIÓTICO	25,000	,0000	9
	Total		13,278	6,2929
Klebsiella	(0.1%)	11,000	,0000	9
	(0.05%)	10,000	,0000	9
	(0.01%)	12,000	,0000	9
	HIDROLATO (0.5%)	10,000	,0000	9
	ETANOL (96%)	5,000	,0000	9
	ANTIBIÓTICO	25,000	,0000	9
	Total		12,167	6,2064
Total	(0.1%)	12,667	1,7489	18
	(0.05%)	12,667	2,7653	18
	(0.01%)	11,000	1,0290	18
	HIDROLATO (0.5%)	10,000	,0000	18
	ETANOL (96%)	5,000	,0000	18
	ANTIBIÓTICO	25,000	,0000	18
	Total		12,722	6,2455

Anexo 19. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar si los datos son normales.

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		D24
N		108
Parámetros normales(a,b)	Media	12,722
	Desviación típica	6,2455
Diferencias más extremas	Absoluta	,213
	Positiva	,213
	Negativa	-,165
Z de Kolmogorov-Smirnov		2,210
Sig. asintót. (bilateral)		,000

a La distribución de contraste es la Normal.

b Se han calculado a partir de los datos.

Anexo 20. Prueba de Kruskal-Wallis. Esta prueba se hizo para comprobar el efecto de las concentraciones sobre cada cepa bacteriana y el comportamiento del efecto hasta las 72 horas de incubación se mantuvo lo que se podría concluir que el tiempo no tuvo inferencia.

Rangos

	TIPO DE BACTERIA	N	Rango promedio	Suma de rangos
D24	Staphylococcus	54	57,50	3105,00
	Difusión	54	51,50	2781,00
	Klebsiella	54	51,50	2781,00
	Total	108		
D48	Staphylococcus	54	57,50	3105,00
	Difusión	54	51,50	2781,00
	Klebsiella	54	51,50	2781,00
	Total	108		
D72	Staphylococcus	54	57,50	3105,00
	Difusión	54	51,50	2781,00
	Klebsiella	54	51,50	2781,00
	Total	108		

Estadísticos de contraste(a,b)

	D24	D48	D72
Chi-cuadrado	1,041	1,041	1,041
gl	1	1	1
Sig. asintót.	,308	,308	,308

a Prueba de Kruskal-Wallis

b Variable de agrupación: TIPO DE BACTERIA

Anexo 21. Prueba de Kruskal-Wallis para comprobar si hubo diferencias entre las concentraciones

Rangos

	CONCENTRACIÓN (CAT.)	N	Rango promedio
D24	(0.1%)	18	68,50
	(0.05%)	18	60,75
	(0.01%)	18	52,25
	HIDROLATO (0.5%)	18	36,50
	ETANOL (96%)	18	9,50
	ANTIBIÓTICO	18	99,50
	Total	108	

Estadísticos de contraste(a,b)

	D24
Chi-cuadrado	88,945
gl	5
Sig. asintót.	,000

a Prueba de Kruskal-Wallis

b Variable de agrupación: CONCENTRACIÓN (CAT.)

Anexo 22. Resultado de las Concentraciones que mostraron significancia 0,000 (< 0.05) y 0,000 (> 0.05) frente a las bacterias utilizando la Prueba de U Mann-Whitney.

Esta prueba se la realizo con el fin de comprobar los efectos de las seis concentraciones como se comportaron frente a las bacterias expuestas para el diseño del trabajo.

concentraciones	Estadísticos de contraste(b)	
	Sig. asintót. (bilateral)	Sig. exacta (Sig. unilateral)
Aceite diluido (0.1%) POR Aceite diluido al (0.01%)	,009 (< 0.05)	,010 (< 0.05)
Aceite diluido (0.1%)POR Hidrolato filtrado (0.5%)	,000 (< 0.05)	,000 (< 0.05)
Aceite diluido(0.1%) POR Etanol al 96% (10ul)	,000 (< 0.05)	,000 (< 0.05)
Aceite diluido (0.1%) POR Antibiótico	,000 (< 0.05)	,000 (< 0.05)
Aceite diluido (0.05%)POR Hidrolato filtrado (0.5%)	,001 (< 0.05)	,010 (< 0.05)
Aceite diluido (0.05%) POR Etanol al 96% (10ul)	,000 (< 0.05)	,000 (< 0.05)
Aceite diluido (0.05%) POR Antibiótico	,000 (< 0.05)	,000 (< 0.05)
Aceite diluido al (0.01%) POR Hidrolato filtrado (0.5%)	,001 (< 0.05)	,010 (< 0.05)
Aceite diluido al (0.01%) POR Etanol al 96%	,000 (< 0.05)	,000 (< 0.05)
5 µl aceite diluido al (0.01%) POR Antibiótico	,000 (< 0.05)	,000 (< 0.05)
Hidrolato filtrado (0.5%) POR Etanol al 95% (10 µl)	,000 (< 0.05)	,000 (< 0.05)
Hidrolato filtrado (0.5%)l POR Antibiótico	,000 (< 0.05)	,000 (< 0.05)
Etanol al 96% (10 µl) POR Antibiótico	,000 (< 0.05)	,000 (< 0.05)
Aceite diluido (0.1%) POR Aceite diluido (0.05%)	,770 (> 0.05)	,791 (> 0.05)
Aceite diluido (0.05%) POR Aceite diluido al (0.01%)	,166 (> 0.05)	,203 (> 0.05)

Anexo 23. Estadísticos descriptivos para las variables del experimento en Microdilucion.

Estadísticos descriptivos

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
BAC	126	1	2	1,50	,502
CONCENT	126	1	7	4,00	2,008
D18	126	,046	,245	,12924	,052807
N válido (según lista)	126				

Estadísticos descriptivos

Variable dependiente: D18

BAC	CONCENT	Media	Desv. típ.	N
<i>Staphylococcus aureus</i>	Aceite puro (0.1%)	,09733	,007159	9
	Aceite diluido (0.05%)	,09900	,008307	9
	Aceite diluido (0.01%)	,10089	,009466	9
	Antibiotico 2mg/1ml	,09222	,006300	9
	etanol al 96% (10 µl)	,09544	,007844	9
	Agua Destilada (10 µl)	,21333	,021857	9
	Hidrolato filtrado (10 µl)	,08944	,029091	9
	Total	,11252	,044106	63
Klebsiella	Aceite puro (0.1%)	,21933	,012855	9
	Aceite diluido (0.05%)	,13033	,027253	9
	Aceite diluido (0.01%)	,09611	,006827	9
	Antibiotico (10 µl)	,09133	,003279	9
	etanol al 96% (10 µl)	,09411	,004859	9
	Agua Destilada (10 µl)	,20222	,030601	9
	Hidrolato filtrado (10 µl l)	,18822	,033026	9
	Total	,14595	,055759	63
Total	Aceite puro (0.1%)	,15833	,063575	18
	Aceite diluido (0.05%)	,11467	,025335	18
	Aceite diluido (0.01%)	,09850	,008375	18
	Antibiotico (10µl)	,09178	,004894	18
	etanol al 96% (10 µl)	,09478	,006367	18
	Agua Destilada (10µl)	,20778	,026423	18
	Hidrolato filtrado (10µl)	,13883	,059112	18
	Total	,12924	,052807	126

Anexo 24. Pruebas no paramétricas complementada con una prueba de Kruskal-Wallis. Esta prueba se realizó con el fin de verificar si hubo diferencias entre las concentraciones frente a las bacterias.

Rangos

	CONCENT	N	Rango promedio
D18	Aceite puro (0.1%)	18	80,56
	Aceite diluido (0.05%)	18	65,17
	Aceite diluido (0.01%)	18	49,94
	Antibiotico (10µl)	18	28,50
	etanol al 96% (10 µl)	18	39,22
	Agua Destilada (10µl l)	18	108,86
	Hidrolato filtrado (0.5%)	18	72,25
	Total	126	

Estadísticos de contraste(a,b)

	D18
Chi-cuadrado	59,801
gl	6
Sig. asintót.	,000

a Prueba de Kruskal-Wallis

b Variable de agrupación: CONCENT

Anexo 25. Pruebas no paramétricas complementada con una prueba de U Mann-Whitney. Esta prueba se la realizo con el fin de verificar que concentración fue la mejor frente a las bacterias

Rangos

	BAC	N	Rango promedio	Suma de rangos
D18	<i>staphylococcus aureus</i>	63	53,98	3401,00
	<i>Klebsiella</i>	63	73,02	4600,00
	Total	126		

Estadísticos de contraste(a)

	D18
U de Mann-Whitney	1385,000
W de Wilcoxon	3401,000
Z	-2,926
Sig. asintót. (bilateral)	,003

a Variable de agrupación: BAC

Anexo 26. Resultado de las Concentraciones que mostraron significancia 0,000 (< 0.05) y 0,000 (> 0.05) frente a las bacterias utilizando la Prueba de Mann-Whitney

concentraciones	Estadísticos de contraste(b)	
	Sig. asintót. (bilateral)	Sig. exacta (Sig. unilateral)
Aceite puro (0.1%)POR Aceite diluido (0.01%)	,017 (< 0.05)	,016 (< 0.05)
Aceite puro (0.1%) POR Antibiótico (10µl) 2mg/1ml	,000 (< 0.05)	,000 (< 0.05)
Aceite puro (0.1%) POR etanol al 96% (10µl)	,001 (< 0.05)	,001 (< 0.05)
Aceite diluido (0.05%) POR Aceite diluido (0.01%)	,050 (< 0.05)	,051 (< 0.05)
Aceite diluido (0.05%) POR Antibiótico (10 µl) 2mg/1ml	,000 (< 0.05)	,000 (< 0.05)
Aceite diluido (0.05%) POR Etanol al 96% (10 µl)	,003 (< 0.05)	,002 (< 0.05)
Aceite diluido (0.01%) POR Agua Destilada (10µl)	,000 (< 0.05)	,000 (< 0.05)
Aceite diluido (0.01%) POR	,013 (< 0.05)	,012 (< 0.05)

Hidrolato filtrado (10 µl)		
Aceite diluido (0.01%) POR Antibiótico (10 µl) 2mg/1ml	,007 (< 0.05)	,006 (< 0.05)
Antibiótico (10ul) 2mg/1ml POR Agua Destilada (10ul)	,000 (< 0.05)	,000 (< 0.05)
Antibiótico (10 µl) 2mg/1ml POR Hidrolato filtrado (0.5%)	,005 (< 0.05)	,004 (< 0.05)
Etanol al 96% (10 µl) POR Agua Destilada (10 µl)	,000 (< 0.05)	,000 (< 0.05)
Etanol al 96% (10µl) POR Hidrolato filtrado (0.5%)	,007 (< 0.05)	,006 (< 0.05)
Agua Destilada (10 µl) POR Hidrolato filtrado (10 µl)	,000 (< 0.05)	,000 (< 0.05)
Aceite puro (0.1%)POR Aceite diluido (0.05%)	,159 (> 0.05)	,161 (>0.05)
Aceite puro (0.1%) POR Agua Destilada (10ul)	,064 (> 0.05)	,064 (> 0.05)
Aceite puro (0.1%) POR Hidrolato filtrado (10µl)	,384 (> 0.05)	,389 (>0.05)
Aceite diluido (0.05%) POR Hidrolato filtrado (0.5%)	,133 (> 0.05)	,134 (>0.05)
Aceite diluido (0.01%) POR etanol al 96% (10µl)	,124 (> 0.05)	,126 (>0.05)
Antibiótico (10 µl) 2mg/1ml POR Etanol al 96% (10µl)	,086 (> 0.05)	,091 (>0.05)