



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

AREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

“Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Piper ecuadorensis* del cantón Saraguro.”

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Flores Maza, Paola Katherine

DIRECTOR: Valarezo Valdez, Eduardo Benito Ph.D.

LOJA – ECUADOR

2015

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Ph.D.

Benito Eduardo Valarezo Valdez

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: **“Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Piper ecuadorensis* del cantón Saraguro”** realizado por Flores Maza Paola Katherine, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, marzo de 2015

f.....

DECLARACION DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Paola Katherine Flores Maza declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: **“Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Piper ecuadorensis* del cantón Saraguro”** de la titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Benito Eduardo Valarezo Valdez director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f) _____

Paola Katherine Flores Maza

1105195646

DEDICATORIA

Al culminar este capítulo importante en mi vida, con el cual he logrado uno de mis objetivos planteados quiero dedicar este trabajo:

A Dios por darme la oportunidad de vivir, por guiar mis pasos y regalarme una vida llena de bendiciones.

A mis abuelitos especialmente a mi abuelita por estar siempre en los momentos importantes, tomada de tu mano inicié mi aprendizaje en la vida, gracias por tu paciencia, tus consejos, por el amor y el apoyo incondicional.

A mis padres por su apoyo, sus oraciones, por preocuparse y amarme con tanta ternura y devoción y ser mi ejemplo de lucha y trabajo, los quiero muchísimo.

A mi hermano por su amor y compañía y

A mis sobrinas por llenar mi vida de alegría.

AGRADECIMIENTOS

Ante todo agradezco a Dios por permitirme llegar a este punto de mi vida, por darme la fuerza, paciencia y tranquilidad necesarias para superar los obstáculos que se me presentaron.

A lo más grande que Dios me ha dado que es mi familia, gracias por su apoyo firme y constante durante estos años, que de una u otra forma estuvieron a mi lado enseñándome que con sacrificio y perseverancia se pueden lograr las metas propuestas.

A mi prima, quien creyó en mí y siempre me apoyó, me dio ánimo constantemente y a través de estos años se convirtió en una hermana más, mi compañera de aventuras. La unión hace la fuerza y como familia siempre hemos estado unidas y seguiremos unidas.

A mis amigos y amigas quienes son una parte más de mi familia y a quienes les agradezco tantas cosas vividas, valoro muchísimo su apoyo incondicional y el cariño que nos une.

También deseo dejar plasmada mi gratitud hacia el PhD. Eduardo Valarezo, por sus enseñanzas consejos y ayuda constante; además de su tiempo y paciencia para lograr alcanzar este objetivo. Dios lo bendiga enormemente y acompañe siempre.

Por último a mis compañeras de tesis porque en esta armonía grupal lo hemos logrado.

Pao Flores

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	I
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN.....	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO I	
MARCO TEÓRICO	
1.1. Aceites esenciales.....	6
1.1.1. <i>Extracción</i>	6
1.1.2. <i>Clasificación</i>	7
1.1.3. <i>Caracterización</i>	7
1.1.3.1. <i>Cromatografías de gases</i>	8
1.1.4. <i>Propiedades</i>	10
1.1.5. <i>Usos y aplicaciones</i>	10
1.2. Actividad Biológica.....	11
1.2.1. <i>Bacterias</i>	11
1.2.1.1. <i>Bacterias Gram-positivas</i>	12
1.2.1.2. <i>Bacterias Gram-negativas</i>	12
1.2.2. <i>Hongos</i>	13
1.3. Actividad Antioxidante.....	14
1.4. Plantas medicinales.....	14
1.5. Flora Ecuatoriana.....	15
1.5.1. <i>Flora aromática del Ecuador</i>	16
1.6. Familia Piperaceae.....	16
1.6.1. <i>Género Piper</i>	16
1.6.1.1. <i>Piper ecuadorensis Sodiro</i>	17

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño experimental.....	19
2.1.1. <i>Recolección de la materia vegetal</i>	20
2.1.2. <i>Determinación de la humedad de la planta</i>	21
2.1.3. <i>Extracción del aceite esencial</i>	21
2.1.3.1. <i>Determinación del rendimiento</i>	23
2.1.4. <i>Determinación de las propiedades físicas</i>	23
2.1.4.1. <i>Densidad relativa</i>	23
2.1.4.2. <i>Índice de Refracción</i>	23
2.1.5. <i>Determinación de la composición química del aceite esencial</i>	24
2.1.5.1. <i>Análisis del aceite esencial por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y al detector de ionización de llama</i>	24
2.1.5.1.1. <i>Preparación de las muestras</i>	25
2.1.5.1.2. <i>Corrida cromatográfica en la columna DB-5MS acoplado a espectrometría de masas</i>	26
2.1.5.1.3. <i>Corrida cromatográfica en la columna HP-INNOWAX acoplada a espectrometría de masas</i>	26
2.1.5.1.4. <i>Identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos químicos del aceite esencial</i>	27
2.1.5.1.5. <i>Corrida cromatográfica en la columna DB-5MS, acoplada al detector de ionización de llama (FID)</i>	28
2.1.5.1.6. <i>Corrida cromatográfica en la columna HP-INNOWAX, acoplada al detector de ionización de llama (FID)</i>	29
2.1.5.1.7. <i>Identificación de los compuestos químicos mediante CG-FID</i>	30
2.1.6. <i>Determinación de la actividad biológica del aceite esencial</i>	31
2.1.6.1. <i>Cepas bacterianas y fúngicas</i>	31
2.1.6.2. <i>Actividad antibacteriana</i>	31
2.1.6.2.1. <i>Método de microdilución en caldo</i>	31
2.1.6.2.2. <i>Preparación de la muestra</i>	32
2.1.6.2.3. <i>Preparación del cultivo bacteriano, “Cultivo Overnight”</i>	32
2.1.6.2.4. <i>Preparación de la suspensión del inóculo bacteriano</i>	32
2.1.6.2.5. <i>Procedimiento</i>	33

2.1.6.3. Actividad antifúngica.....	34
2.1.6.3.1. Preparación de la muestra.....	34
2.1.6.3.2. Preparación de la suspensión de los inóculos fúngicos.....	34
2.1.6.3.3. Procedimiento.....	34
2.1.6.3.4. Lectura de las placas de concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana y antifúngica e interpretación de los resultados.....	34
2.1.7. Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial.....	35
2.1.7.1. Preparación de la muestra	36
2.1.7.2. Método ABTS ⁺	37
2.1.7.2.1. Solución patrón y de trabajo de ABTS ⁺	37
2.1.7.2.2. Estándar Trolox y BHT para ABTS ⁺	37
2.1.7.2.3. Lectura de las muestras.....	38
2.1.7.3. Método DPPH.....	38
2.1.7.3.1. Solución patrón y de trabajo para DPPH.....	39
2.1.7.3.2. Estándar Trolox y BHT para DPPH.....	39
2.1.7.3.3. Lectura de las muestras.....	39
2.1.7.4. Análisis de los datos obtenidos mediante ABTS ⁺ y DPPH.....	40
CAPITULO III	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1. Humedad de <i>Piper ecuadorese</i>	42
3.2. Rendimiento de <i>Piper ecuadorese</i>	42
3.3. Propiedades físicas.....	44
3.3.1. Densidad relativa.....	44
3.3.2. Índice de refracción.....	44
3.4. Composición química del aceite esencial de <i>Piper ecuadorese</i>	45
3.4.1. Análisis cualitativo y cuantitativo.....	45
3.4.1.1. Datos espectrales del compuestos no identificado.....	60
3.5. Actividad Biológica del aceite esencial de <i>Piper ecuadorese</i>	61
3.5.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana.....	62
3.5.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antifúngica.....	64
3.6. Actividad antioxidante.....	65
3.6.1. Método ABTS ⁺	65
3.6.1.1. Lectura de los estándares Trolox/BHT.....	65

3.6.1.2. <i>Lectura de las muestras de aceite esencial</i>	66
3.6.2. <i>Método radical DPPH</i>	67
3.6.2.1. <i>Lectura de los estándares Trolox/BHT</i>	67
3.6.2.2. <i>Lectura de las muestras de aceite esencial</i>	68
CONCLUSIONES.....	70
RECOMENDACIONES.....	71
BIBLIOGRAFIA.....	72
ANEXOS	
Anexo 1. Determinación de Humedad.....	78
Anexo 2. Determinación de la densidad relativa.....	79
Anexo 3. Determinación del índice de refracción.....	81
Anexo 4. Referencias bibliográficas - Índice de Kovats.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático de un cromatógrafo de gases.....	8
Figura 2. Detector de ionización de llama.....	10
Figura 3. Muestra botánica de <i>Piper ecuadorensis</i>	17
Figura 4. Esquema de los análisis realizados.....	19
Figura 5. Área de recolección de la especie <i>Piper ecuadorensis</i>	20
Figura 6. Muestra de <i>Piper ecuadorensis</i> en su hábitat natural.....	21
Figura 7. Proceso de destilación.....	22
Figura 8. a) Picnómetro con agua b y c) Picnómetro con aceite	23
Figura 9. Refractómetro ABBE.....	24
Figura 10. Cromatógrafo de gases.....	24
Figura 11. a) Preparación de muestras para las corridas cromatográficas b) Viales listo para la inyección.....	25
Figura 12. Condiciones operacionales para CG-EM en la columna DB-5MS.....	26
Figura 13. Condiciones operacionales para CG-EM en la columna HP-INNOWAX.....	27
Figura 14. Parámetros operacionales de la corrida cromatográfica en la columna DB-5MS acoplada al detector de ionización de llama (FID).....	29
Figura 15. Parámetros operacionales de la corrida cromatográfica en la columna HP-INNOWAX acoplada al detector de ionización de llama (FID).....	30
Figura 16. Modelo de Microplaca TC96 para bacterias con las concentraciones del aceite ($\mu\text{g/mL}$).....	33
Figura 17. Microplaca previa a la lectura de la CMI antibacterial.....	35
Figura 18. Espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS Scanning 333907.....	36
Figura 19. Muestras del aceite de <i>P. ecuadorensis</i> analizadas mediante el método ABTS ⁺	38
Figura 20. Muestras del aceite de <i>P. ecuadorensis</i> analizadas mediante método DPPH.....	39
Figura 21. Perfil cromatográfico del aceite esencial de <i>P. ecuadorensis</i> obtenido en la columna DB-5MS.....	45
Figura 22. Perfil cromatográfico del aceite esencial de <i>P. ecuadorensis</i> obtenido en la columna HP-INNOWAX.....	46
Figura 23. Compuestos mayoritarios en columna no polar DB-5MS.....	56

Figura 24. Compuestos mayoritarios en columna polar HP-INNOWAX	57
Figura 25. Compuesto no identificado – Columna polar HP-INNOWAX.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos de prueba.....	31
Tabla 2. Medios de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada bacteria.....	32
Tabla 3. Medios de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada hongo.....	34
Tabla 4. Volumen necesario para cada dilución en aceite.....	36
Tabla 5. Volumen necesario para cada dilución en Trolox y BHT.....	38
Tabla 6. Porcentaje de Humedad de la materia vegetal.....	42
Tabla 7. Porcentaje de Rendimiento de la materia vegetal.....	43
Tabla 8. Densidad relativa del aceite esencial de <i>Piper ecuadoreense</i>	44
Tabla 9. Índice de refracción del aceite esencial de <i>Piper ecuadoreense</i>	45
Tabla 10. Composición química de <i>Piper ecuadoreense</i>	47
Tabla 11. Comparación de la cantidad relativa (%) de los compuestos determinados por CG-MS y CG-FID.....	58
Tabla 12. CMI antibacteriana ($\mu\text{g}/\text{mL}$) del aceite esencial frente a 7 cepas bacterianas.....	62
Tabla 13. CMI del aceite esencial frente a dos cepas fúngicas.....	64
Tabla 14. Datos del método ABTS ⁺ para los estándares TROLOX y BHT.....	66
Tabla 15. Datos del método ABTS ⁺ para el aceite esencial.....	66
Tabla 16. Datos del método DPPH para los estándares TROLOX y BHT.....	67
Tabla 17. Datos del método DPPH para el aceite esencial.....	68

RESUMEN

El aceite esencial de *Piper ecuadorensis* se obtuvo mediante hidrodestilación. La composición química del aceite esencial se determinó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y al detector de ionización de llama. La actividad biológica fue evaluada por el método de microdilución en caldo y la actividad antioxidante mediante dos métodos espectrofotométricos: ABTS⁺ y DPPH. También se determinó las propiedades físicas del aceite. Se identificaron 56 compuestos que representan el 98,98% del aceite esencial, los componentes más representativos fueron: α -Phellanderene (6,89%), δ -Elemene (6,83%), β Elemene (3,55%), α -Humulene (3,20%), Bicyclogermacrene (12,98%), δ -Cadinene (3,85%), (E)-Nerolidol (6,88%), Germacrene D-4-ol (5,04%), 3-Thujopsanone (11,59%) y Shyobunol (5,79%). La densidad fue de 0,9269 g/cm³ y el índice de refracción de 1,5043. El aceite esencial presentó una actividad microbiana moderada frente a *Staphylococcus aureus* (CMI 125 μ g/mL) mientras que las demás cepas bacterianas no fueron inhibidas a las dosis probadas; en lo que respecta a hongos mostró buena actividad frente a *T. mentagrophytes* (CMI 62,5 μ g/mL) y *T. rubrum* (CMI 31,5 μ g/mL). El aceite esencial de esta especie no reveló actividad antioxidante a las concentraciones evaluadas.

PALABRAS CLAVES: *Piper ecuadorensis*, aceite esencial, Bicyclogermacrene, CMI, DPPH, ABTS⁺.

ABSTRACT

The essential oil of *Piper ecuadorensis* was obtained by hydrodistillation. The chemical composition of the essential oil was determined by gas chromatography coupled with mass spectrometry and the flame ionization detector. The biological activity was evaluated by broth microdilution method and the antioxidant activity by two spectrophotometric methods: ABTS assay, and the DPPH method. Oil physical properties were also determined. Fifty-six compounds were identified representing 98.98 % of the essential oil. The most representative components were: α -Phellanderene (6,89%), δ -Elemene (6,83%), β Elemene (3,55%), α -Humulene (3,20%), Bicyclogermacrene (12,98%), δ -Cadinene (3,85%), (E)-Nerolidol (6,88%), Germacrene D-4-ol (5,04%), 3-Thujopsanone (11,59%), γ Shyobunol (5,79%). The density was 0,9269 g/cm³ and the refractive index 1,5043. The essential oil presented a moderate microbial activity against *Staphylococcus aureus* (MIC 125 μ g/mL), while other bacterial strains were not inhibited at the doses tested, with respect to fungi showed good activity against *T. mentagrophytes* (CMI 62,5 μ g / mL), and *T. rubrum* (CMI 31,5 μ g/mL). The essential oil of this species do not showed antioxidant activity at various concentrations evaluated.

Key words: *Piper ecuadorensis*, essential oil, Bicyclogermacrene, CMI, DPPH, ABTS⁺

INTRODUCCIÓN

Las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo. De acuerdo a la OMS (1979) una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (Bermúdez et al., 2005).

En los últimos años se ha evidenciado un extraordinario auge de la química de los productos naturales en el ámbito mundial. Entre los tres grupos de productos de origen botánico que mayor probabilidad tendrán en la próxima década se encuentran los aceites esenciales y sus constituyentes, provenientes de diferentes especies vegetales (Acevedo et al., 2013).

Como respuesta a esta tendencia, los aceites esenciales son uno de los principales productos naturales usados en un amplio rango de materiales comerciales y de consumo masivo; los cuales se definen como mezclas complejas de sustancias orgánicas volátiles, provenientes en su mayoría del metabolismo de organismos vegetales (Pino, N. et al., 2009).

Estudios realizados en especies de la familia Piperaceae han revelado una gran variedad de efectos biológicos, lo que la convierte en una de las más prometedoras para la búsqueda de compuestos bioactivos. El género más representativo es el género *Piper* es uno de los más diversos géneros entre el linaje de las angiospermas, del cual se puede obtener aceites esenciales que presentan gran diversidad de compuestos, dada su riqueza química y aplicaciones en la medicina tradicional (Celis et al., 2008).

Piper ecuadorensis arbusto nativo de Ecuador y Colombia, la planta es conocida popularmente como "matico de monte", se utiliza como un remedio tradicional por diferentes comunidades indígenas de las provincias de Loja y Zamora en Ecuador; como por ejemplo en el tratamiento de la resaca, como desinfectante o cicatrizante de heridas (Ramirez, J. et al., 2013).

Piper ecuadorensis plata nativa del sur del Ecuador, aún no reporta estudios fitoquímicos, ni biológicos en lo que respecta a aceite esencial, razón por la cual es importante el estudio de nuevos compuestos útiles con propiedades, antifúngicas y bactericidas que inhiban el crecimiento de un amplio grupo de microorganismos patógenos, brindando información para futuros estudios y aplicaciones de la mencionada especie con el fin de aprovechar nuestros recursos naturales como alternativa de salud.

El presente estudio consiste en la determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *P. ecuadorensis* del cantón

Saraguro. Esta investigación contribuye al estudio de la flora aromática del cantón Saraguro (Región Sur del Ecuador) que se está llevando a cabo en la Sección de Ingeniería de Procesos del Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja.

Se pretende determinar los compuestos químicos presentes en el aceite esencial de *Piper Ecuadorensis* mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-EM) y al detector de ionización de llama (GC-FID), empleando dos tipos diferentes de columnas, DB-5MS y HP-INNOWAX. Las propiedades físicas (densidad e índice de refracción) del aceite esencial que nos sirven como indicadores de calidad, también es necesario documentar estas características para estudios más avanzados del aceite dentro de la industria farmacológica.

Además determinar si esta especie tiene potencial antifúngico y/o actividad antibacteriana mediante el método de microdilución en caldo que evalúa la concentración mínima inhibitoria (CMI) usando una concentración de 5×10^5 ufc/mL para bacterias Gram-negativas [*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC9997), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2)] y bacterias Gram-positivas [*Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)], y una concentración de 5×10^4 esporas/mL para hongos dermatofitos [*Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185)]

Recientemente, se ha incrementado la búsqueda de antioxidantes de origen natural para ser usados en alimentos y como base de nuevos fármacos y así reemplazar los antioxidantes sintéticos debido a las restricciones de carcinogenicidad que éstos presentan (Muñoz et al., 2007). Lo cual lo hace un tema importante para el estudio de diversas especies, por lo que se consideró importante evaluar la actividad antioxidante de dicha especie mediante dos métodos espectrofotométricos: capacidad de atrapamiento del catión-radical ABTS⁺ y del radical DPPH.

CAPÍTULO I
MARCO TEORICO

1.1. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios, producidos al momento de activarse mecanismos de defensa como respuesta a factores ambientales y ecológicos (Rodríguez et al., 2012). Son biosintetizados por plantas aromáticas y pueden obtenerse de cualquier órgano de la misma (hojas, raíces, tallo, flores, capullos, etc.). Están constituidos por una variedad de constituyentes químicos volátiles, principalmente terpenoides, así como compuestos aromáticos y alifáticos que le proporcionan características como olor, sabor y actividad biológica, además tienen gran aplicación en la industria farmacéutica, sanitaria, cosmética, agrícola y de alimentos (Bakkali et al., 2008).

Son productos apreciados ya desde la antigüedad por sus propiedades medicinales. No obstante, el interés por sus diversas aplicaciones ha experimentado un notable incremento en las últimas décadas (Cañigueral & Vila, 2007). Como respuesta a esta tendencia, los aceites esenciales son uno de los principales productos naturales usados en un amplio rango de materiales comerciales y de consumo masivo (Pino, N. et al., 2009).

1.1.1. Extracción.

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, enfleurage y con fluidos supercríticos. Una de las técnicas más utilizadas para la extracción de aceites esenciales es la destilación por arrastre con vapor, en la que factores como el tamaño de partícula del material vegetal, el factor de empaquetamiento o densidad del lecho y el tiempo de extracción, influyen en la composición y rendimiento de los aceites obtenidos (Martínez, 2001).

En la destilación por arrastre con vapor de agua, la materia prima vegetal generalmente fresca es cargada en un hidrodestilador, de manera que forme un lecho fijo compactado, es sometido a una corriente de vapor de agua sobrecalentada. Conforme el vapor entra en contacto con el lecho, la materia prima se calienta y va liberando el aceite esencial contenido, siendo es arrastrado y posteriormente condensado (Martínez, 2001; Rodríguez et al., 2012).

A la salida del condensador, se obtiene una emulsión líquida inestable, que es separada en un decantador dinámico o florentino. El proceso termina cuando el volumen del aceite esencial acumulado en el florentino no varíe con el tiempo de extracción (Rodríguez et al., 2012). Esta técnica es muy utilizada especialmente a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada (Martínez, 2001).

1.1.2. Clasificación.

Según Martínez (2001) los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.

De acuerdo con su consistencia se clasifican en:

- Las Esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente.
- Los Bálsamos son de consistencia más espesa, 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.

Teniendo en cuenta su origen se clasifican como: naturales, artificiales y sintéticos.

- Los naturales, son los que se obtienen directamente de la planta, sin ningún tipo de modificación, con rendimientos tan bajos que resultan muy costosos.
- Los artificiales se producen por medio de mezclas o enriqueciendo la esencia con uno o varios de sus componentes.
- Los aceites esenciales sintéticos son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales la mayoría de las veces son producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes.

De acuerdo con el tipo de sustancias que son los componentes mayoritarios.

- Según esto 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.).

1.1.3. Caracterización.

Según Stashenko (2009) el proceso de caracterización de un aceite se divide en varios pasos, cada uno de los cuales puede ser de menor a mayor relevancia para la toma de decisión sobre la aplicación del aceite dado en una de las ramas de la industria (alimentos, bebidas, cosméticos, etc.) o en medicina (aromaterapia, homeopatía, fitofármacos). De esta manera

se somete a una caracterización completa llevando a cabo los siguientes pasos:

1. **Evaluación organoléptica (sensorial):** se lo realiza a través de expertos denominados catadores.
2. **Determinación de propiedades físico químicas:** como densidad, índice de refracción, etc. Estos análisis son principalmente usados como pruebas de pureza y control de calidad básica de los aceites
3. **Determinación de propiedades biológicas:** por ejemplo las propiedades antimicrobianas y antioxidantes son importantes para que el aceite sea un excelente candidato como ingrediente natural en productos cosméticos o de higiene personal. Siempre y cuando no posea propiedades alergénicas o tóxicas.
4. **Determinación de la composición química:** corresponde a uno de los análisis más importantes empleando técnicas de cromatografía de gas. La cual es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Además tiene la ventaja de disponer de detectores mucho más universales (por ejemplo, el de ionización de llama). Asimismo, para numerosas aplicaciones, los métodos son más simples, más rápidos y más sensibles.

1.1.3.1. Cromatografía de gases.

La cromatografía gases es una técnica que separa mezclas en componentes individuales, en la cual una fase se mantiene fija y la otra se mueve a través de ella. La fase móvil (el disolvente que desciende a través de la columna) es un gas (generalmente Helio (He), u otros como: Nitrógeno (N₂) o hidrogeno (H₂)). La fase estacionaria (la que se encuentra fija en el interior) es normalmente un líquido no volátil viscoso enlazado químicamente a las paredes interiores de un tubo capilar o a la superficie de las partículas sólidas empaquetadas dentro de la columna. El reparto de solutos entre la fase móvil y estacionaria da lugar a la separación (Harris, 2007).

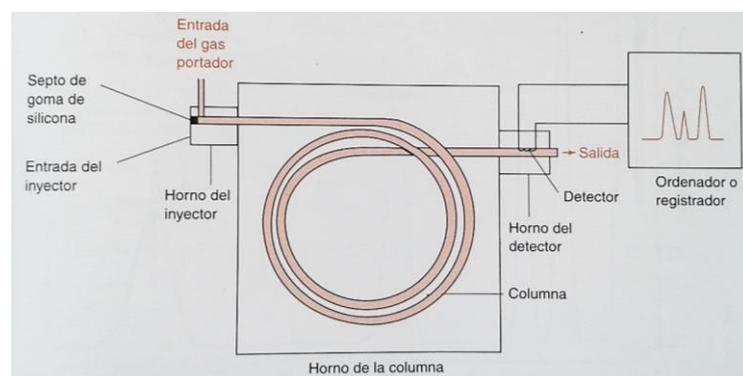


Figura 1. Diagrama esquemático de un cromatógrafo de gases
Fuente: Harris (2007).

En la figura 1, se muestra un diagrama esquemático de un cromatógrafo de gases. La muestra de un líquido volátil o de un gas se inyecta a través de un septo (diafragma de silicona), en un inyector caliente, en cuyo interior se evapora rápidamente. El vapor es arrastrado a través de la columna por el gas portador (He , N_2 o H_2), y los analitos después de separados llegan al detector, cuya respuesta aparece en la pantalla de un ordenador o en un registrador. La columna debe estar lo suficientemente caliente para que los analitos alcancen una presión de vapor adecuada y eluyan en un tiempo razonable. El detector se mantiene a una temperatura más elevada que la columna, de forma que los analitos se encuentren en forma gaseosa (Harris, 2007).

En la actualidad, la separación de los componentes volátiles y semivolátiles de una muestra se realiza por cromatografía de gases; la combinación de altas resoluciones, la sensibilidad y los tiempos cortos de análisis la han convertido en una técnica de rutina usada en la mayoría de los laboratorios químicos, por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros de cada componente. Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, CG y EM da lugar a una técnica combinada CG-EM que permite la separación e identificación de mezclas complejas (Gutiérrez & Droguet, 2002).

El detector de ionización de llama, es tal vez el más ampliamente utilizado en cromatografía de gases, debido a su gran sensibilidad, amplio intervalo de respuesta lineal, poco ruido, robustez y sencillez. Es el detector que normalmente se usa con columnas capilares (Skoog et al., 1997). Este tipo de detector es de respuesta universal, ya que es selectivo hacia los compuestos que presentan enlaces C-H, por lo que son muy pocos los compuestos que no dan señal en él. (Arderiu et al., 1997).

Un detector de ionización de llama, como el que se muestra en la figura 2, se basa en que el eluato se quema en una mezcla de H_2 y aire. Los átomos de carbono producen radicales CH, que producen iones CHO^+ . La producción de iones es estrictamente proporcional al número de átomos de carbono susceptibles de ionizarse, que penetran en la llama. Los cationes que se producen en la llama conducen la corriente eléctrica desde la punta del quemador que actúa de ánodo a un colector catódico. Esta corriente es la señal que da el detector (Harris, 2007).

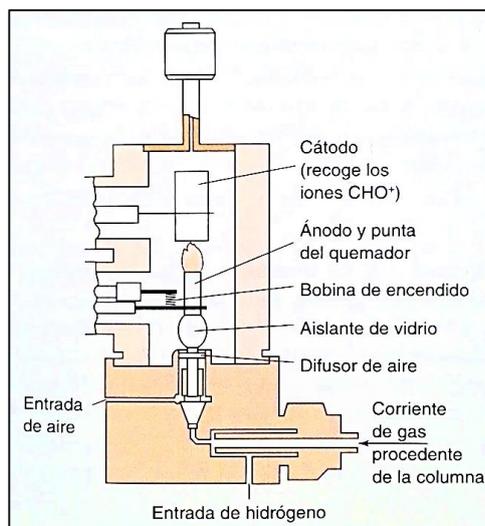


Figura 2. Detector de ionización de llama
Fuente: Harris (2007).

El grado de ionización térmica es directamente proporcional a la cantidad de muestra quemada en la llama. La corriente producida es amplificada y transmitida a un registrador (Arderiu et al., 1997).

1.1.4. Propiedades.

Los aceites esenciales generalmente son fluidos, más livianos que el agua, de olor fuerte y penetrante que recuerdan a la planta de origen, incoloros o amarillentos, translúcidos, miscibles en solventes orgánicos e inmiscibles en agua. Son inflamables, no son tóxicos, aunque pueden provocar alergias en personas sensibles a determinados terpenoides (Castro, 2008).

Según la Agencia de Drogas y Alimentos de E.E.U.U. (FDA) (Code of Federal Regulations, 2003) citada por Rodríguez et al. (2012) los aceites esenciales son aceptadas como sustancias seguras, son inocuos, mientras la dosis suministrada no supere los límites de toxicidad. Sufren degradación química en presencia de la luz solar, del aire, del calor, de ácidos y álcalis fuertes, generando oligómeros de naturaleza indeterminada. Son solubles en los disolventes orgánicos comunes. Casi inmiscibles en disolventes polares asociados (agua, amoníaco). Tienen propiedades de solvencia para los polímeros con anillos aromáticos presentes en su cadena.

1.1.5. Usos y aplicaciones.

Todos los aceites esenciales pueden presentar diversos tipos de funcionalización, aunque básicamente están orientados a la perfumería; la cosmética; la industria farmacéutica, como aditivo e insumo para sintetizar compuestos, como agentes carminativos, estimulantes,

diuréticos y antirreumáticos, algunos poseen propiedades insecticidas, antifúngicas y antibacterianas frente a microorganismos patógenos; en la industria alimentaria, como aditivo e insumo para la fabricación de productos de higiene personal y de limpieza doméstica (Rodríguez et al., 2012; Sánchez et al., 2009).

En los últimos años, la aromaterapia ha tenido un gran crecimiento y aceptación en el mercado mundial. La comercialización de los aceites esenciales puros, como ingredientes de los productos aromaterápicos, ha creado una mayor demanda y ha motivado la búsqueda de nuevos aromas, más exóticos y con propiedades seudofarmacológicas. Otras aplicaciones nuevas surgidas últimamente y con un gran potencial futuro son de ingredientes para la formulación de biocidas para uso veterinario o agrícola (Rodríguez et al., 2012).

1.2. Actividad Biológica

En los últimos años, un gran número de aceites esenciales y sus constituyentes han sido investigados por sus propiedades antimicrobianas frente algunas bacterias y hongos. Actualmente especies de plantas promisorias de uso etnofarmacológico son fuentes de información para el descubrimiento de posibles sustancias con importante actividad biológica; la investigación en plantas, se realiza en muchas latitudes con resultados muy promisorios (Ramírez, L. & Marin, 2009).

Al ser utilizados antibacterianos sintéticos y la tendencia actual por parte de los consumidores de no adquirir productos con este tipo de compuestos, se ha generado un interés considerable en la investigación de los aceites esenciales como agentes antimicrobianos. Teniendo en cuenta que estos están conformados por un número amplio de compuestos químicos, lo más probable es que su acción antibacteriana no sea atribuible a un mecanismo específico, sino a una sinergia entre todos los componentes (Yáñez & Cuadro, 2012).

Una característica importante que presentan los aceites esenciales es su hidrofobicidad, lo que les permite adherirse a la membrana de la célula bacteriana, afectando su presión y por consiguiente la hace más permeable ocasionando la fuga de iones presentes al interior de la célula. Básicamente el efecto antimicrobiano que ejerce un aceite esencial se debe a su efecto a nivel de la perturbación de la membrana citoplasmática, la alteración de la fuerza motriz de protones y el flujo de electrones. Los daños a la pared y membrana de la célula ocasionan la fuga de macromoléculas y por consiguiente la lisis (Yáñez & Cuadro, 2012).

1.2.1. Bacterias.

Las bacterias poseen un tamaño medio que oscila entre 2 y 10 μm , su citoplasma está repleto

de ribosomas, el material genético está constituido por ácido desoxirribonucleico (DNA), y forman un conglomerado compacto carente de membrana nuclear y una membrana citoplasmática que confiere la forma a la célula. Se clasifican en dos grupos diferentes en función de la estructura de su pared, un grupo las denominadas Gram-positivas, que solo poseen peptidoglicanos; el otro, las denominadas Gram-negativas, tienen adosada por fuera del peptidoglicano una membrana rica en polisacáridos (Prats, 2006)

1.2.1.1. Bacterias Gram-positivas.

- ***Staphylococcus aureus***

Microorganismo de gran importancia médica, reconocido como uno de los principales agentes patógenos para el humano, contiene más de 30 especies y muchas son habitantes naturales de la piel y las membranas mucosas. No forma esporas, puede encontrarse solo, en pares, en cadenas cortas o en racimos, anaerobio facultativo (Bustos et al., 2006). Coloniza e infecta a pacientes hospitalizados con defensas disminuidas y a personas inmunocompetentes en la comunidad. Produce diversas patologías, desde un absceso de piel hasta septicemias mortales y choque tóxico estafilocócico (SSTS) (Hurtado et al., 2002).

- ***Enterococcus faecalis***

Habitante normal del tracto gastrointestinal humano, anaerobio facultativo, inmóvil, no esporulado. Han sido identificados como patógenos oportunistas para los humanos, pudiendo causar diferentes enfermedades como la endocarditis, bacteriemias enterocócicas e infecciones. Numerosos estudios han mostrado que estos microorganismos pueden transmitirse de una persona a otra en el hospital por instrumentos clínicos o a través de las manos de los trabajadores de la salud (Díaz et al., 2010).

1.2.1.2. Bacterias Gram-negativas.

- ***Pseudomona aeruginosa***

Bacilos móviles, tiene forma de bastón, aerobio obligado, forma colonias redondas y lisas de un color verdoso fluorescente. Tiene una amplia distribución en la naturaleza y suele estar presente en medios húmedos de los hospitales. Causa enfermedades en personas con defensas anormales (Brooks et al., 2011).

- ***Klebsiella Neumoniae***

Bacilos gramnegativos que muestran multiplicación mucoide, capsulas de polisacárido de

gran tamaño y falta de motilidad. Produce una pequeña porción de las neumonías bacterianas, consolidación pulmonar necrosante por hemorragia extensa, infecciones urinarias y bacteriemia en pacientes débiles (Brooks et al., 2011).

- ***Proteus vulgaris***

Las bacterias del genero *Proteus* producen infecciones en el ser humano solo cuando las bacterias salen del tubo digestivo. Se encuentran en las infecciones urinarias y producen bacteriemia, neumonía y lesiones focales en pacientes débiles o en los que reciben infusiones intravenosas. *Proteus vulgaris* y *Morganella morganii* son microorganismos patógenos de infecciones hospitalarias (Brooks et al., 2011).

- ***Escherichia coli***

Bacilo gramnegativo, anaerobio facultativo, coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento, se considera un microorganismo de flora normal pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño. Cuando se presentan infecciones de importancia clínica suele deberse a *E. coli*, es la causa más frecuente de infección de vías urinarias, diarrea, septicemia y meningitis (Brooks et al., 2011).

- ***Salmonella typhimurium***

Bacilos móviles, pueden ser patógenas para el ser humano o en los animales cuando se adquieren por la vía oral. Es causa frecuente de gastroenteritis, además de producir otras infecciones, como por ejemplo bacteriemias en pacientes inmunodeprimidos por el VIH (Brooks et al., 2011; Gallardo et al., 2003).

1.2.2. Hongos.

Son organismos eucariotas, cada uno tiene al menos un núcleo, una membrana nuclear, un retículo endoplasmático, mitocondrias y un aparato secretor. Crecen en forma de aglomeración de filamentos ramificados y entrelazados (“hifas”) y pueden reproducirse por medio de procesos asexuales o a través de esporas sexuales, aunque la mayoría se encuentra como saprofitos, algunos pueden causar patologías al hombre. Las micosis cutáneas son causadas por hongos que infectan los tejidos queratinizados superficiales, los hongos más importantes son los dermatofitos que pertenecen a 3 géneros: *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton* (Brooks et al., 2011; Prats, 2006).

- ***Trichophytum rubrum***

Es el agente causal más frecuente en tiñas del cuerpo, de la ingle, de los pies, así como de onicomycosis. *T. rubrum* parasita con frecuencia los pies y las uñas causando en estas últimas la destrucción de la lámina ungueal. Es un hongo frecuentemente aislado en lesiones clínicamente sospechosas de tiña de la uñas y de la piel lampiña, sobre todo en pies e ingle. En las uñas llega a provocar la distrofia total de la lámina ungueal (Hernández et al., 2007).

- ***Trichophytum mentagrophytes***

Es uno de los que con más frecuencia infecta humanos y animales y solo es superado en la literatura por *T. rubrum*. Puede producir *tinea capitis*, *tinea pedis*, *tinea corporis*, *tinea barbae* y *tinea unguium* (Rueda, 2002).

1.3. Actividad Antioxidante

Los antioxidantes son nutrientes capaces de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, sin perder su estabilidad electroquímica. Actúan donando electrones y evitando que capturen los radicales libres de las células. Los antioxidantes utilizados en alimentos, previenen o inhiben el desarrollo de la rancidez o la aparición de otros compuestos de deterioro debido a la oxidación, además son ampliamente utilizados para prevenir enfermedades cardiovasculares, arterosclerosis, enfermedades degenerativas, envejecimiento prematuro, entre otras (Mesa et al., 2011).

Se ha demostrado que los aceites esenciales presentan propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes (Frassinetti et al., 2011). Los antioxidantes de origen natural se usan cada vez con mayor frecuencia no solamente en los alimentos, sino también en diferentes preparados farmacéuticos y cosméticos (Arango & Vásquez, 2008).

El uso de antioxidantes naturales son de gran interés en la industria alimentaria, ya que su posible uso como aditivos naturales surgido de una creciente tendencia a reemplazar los antioxidantes sintéticos con los naturales, porque la mayoría actualmente empleados, tales como BHA (butil hidroxianisol) y BHT (butil hidroxitolueno) puede ser citotóxicos y aumentar el desarrollo de células cancerosas. De ahí que también se ensayaron las propiedades antioxidantes de los aceites (Frassinetti et al., 2011).

1.4. Plantas medicinales

Es indudable la importancia de las plantas y los árboles para la medicina moderna. Entre otras, son fuente directa de agentes terapéuticos, se emplean como materia prima para la

fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos puede servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas y tales principios se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos (Quesada, 2008).

El tema de las plantas medicinales ha cobrado increíble auge en los últimos años y cada vez son más las disciplinas científicas que se han dado a la tarea de investigarlas y aplicarlas para el mundo moderno. La industria farmacéutica ha obtenido del reino vegetal la materia prima necesaria para la elaboración de casi el 30% de los productos farmacéuticos. Esta tendencia va en aumento con la búsqueda de nuevas plantas útiles en las selvas tropicales, ya que la industria farmacéutica empieza a agotar las posibilidades de nuevos compuestos a partir de la ingeniería química y genética o de la síntesis de sustancias químicas a partir del petróleo (Heras, 2012).

La diversidad de plantas medicinales disponible varía según las regiones y los ecosistemas de cada zona donde habitan, debido a ello se debe conservar el ambiente que las sustenta, por lo tanto dichas plantas medicinales son un recurso que debe conocerse, usarse y cuidarse como parte del patrimonio natural del país (Quesada, 2008).

1.5. Flora Ecuatoriana

Ecuador, con un área de 283 791 km², se encuentra en plena zona tropical. El país entero está atravesado longitudinalmente por la Cordillera de los Andes, la cual define a lo largo de todo el país una orografía y topografía muy marcada y diferente. Además, sus costas están influenciadas por el paso de la corriente fría y seca de Humboldt. La combinación de todos estos factores hace posible que en Ecuador existan una gran variedad de climas y tipos de vegetación, que albergan 17 058 especies botánicas 16 000 excluyendo a las Pteridofitas (Muriel, 2008).

Ecuador es un país con riqueza incalculable en cuanto a biodiversidad y hábitats se refiere, sin embargo la mayoría de esta riqueza no es conocida y la pérdida de hábitats y ecosistemas pone en peligro el conocer y valorar sus potencialidades, esto sumado a la riqueza cultural y la aplicación de dicha biodiversidad, se concretan en una fuente potencial para la investigación (Andrade et al., 2009).

La gran diversidad de la flora ecuatoriana ha sido reconocida y estudiada desde hace mucho tiempo, pero no fue sino hace ocho años que, con la publicación del Catálogo de las Plantas Vasculares del Ecuador se documentó la presencia de más de 16 000 especies de plantas. Este número en los últimos años se ha incrementado en un 6%, por lo que en la actualidad el

número de especies vasculares sobrepasa las 17 000 (Balslev et al., 2008).

1.5.1. Flora aromática del Ecuador.

En Ecuador el uso de plantas medicinales está inmerso en la cotidianidad de sus habitantes. La medicina popular se practica principalmente por habitantes de zonas rurales, pero también por ciudadanos de toda clase social. Se pueden encontrar gran variedad de plantas con usos medicinales que se expenden en mercados de la Sierra, Costa y Amazonía (De la Torre et al., 2008).

El rango de registros de usos por familias varía entre 1 y 393. Las familias con más registros de uso son Solanaceae (393), Malpighiaceae (151), Piperaceae (135), Rubiaceae (130), Lamiaceae (89) y Monimiaceae (59). Sin embargo, muchas familias están representadas por una única especie. Más del 80% de los taxones son nativos del Ecuador. Entre las plantas introducidas se destacan las especies de la familia Rutaceae, que al igual que las especies de las familias Piperaceae y Lamiaceae, se caracterizan por tener olores muy atractivos (Yépez, 2008).

1.6. Familia Piperaceae

La familia Piperaceae comprende un número extenso de arbustos, hierbas y lianas que se encuentran en lugares sombríos y húmedos de todo el mundo. Desde la antigüedad la Familia Piperaceae, se conoce como una de las familias más grandes e importantes (Parra, 2011), comprende unos catorce géneros y 1 950 especies de todo el mundo, siendo *Piper* y *Peperomia* los géneros más abundantes. Una revisión de la flora ecuatoriana reporta cuatro géneros de la familia Piperaceae, incluyendo 215 especies de *Piper*, 75 de ellas endémicas (Ramírez, J. et al., 2013).

Estudios realizados en especies de la familia *Piperaceae* han revelado una gran variedad de efectos biológicos, lo que la convierte en una de las más promisorias para la búsqueda de compuestos bioactivos. El género más representativo es el género *Piper*, del cual se puede obtener aceites esenciales que presentan gran diversidad de compuestos (Celis et al. 2008), además de su gran importancia económica debido a sus aplicaciones a nivel alimenticio, industrial y medicinal (Parra, 2011).

1.6.1. Género Piper.

Especies del género *Piper* son ampliamente utilizados en varias formas en medicina tradicional por sus efectos antibacterianos, antifúngicos, y desinfectante, para prevenir

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño experimental

La presente Investigación se llevó a cabo en el Departamento de Química, Sección de Ingeniería de Procesos de la Universidad Técnica Particular de Loja, para lo cual se utilizó la siguiente metodología.



Figura 4. Esquema de los análisis realizados
Fuente: La autora

2.1.1. Recolección de la materia vegetal.

La especie *Piper ecuadorensis* fue recolectada en el bosque de Washapamba, ubicado a diez minutos del cantón Saraguro, a una altura de 2190 m s.n.m., con las siguientes coordenadas 692104(E), 9593236(N). En la figura 5 se observa la ubicación geográfica de dicha especie, el mapa fue elaborado utilizando el programa ArcGis v3.21 en las instalaciones de la UTPL.

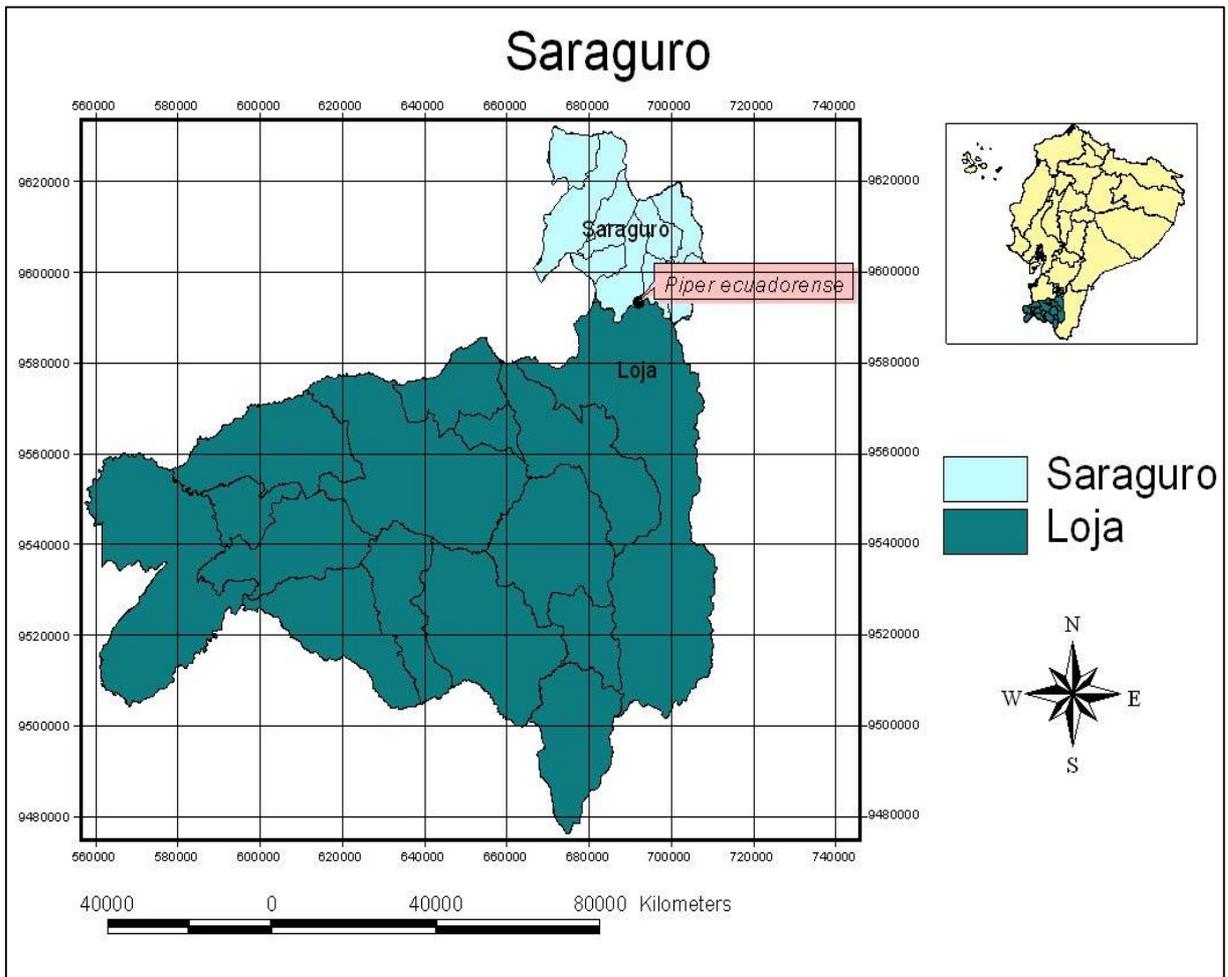


Figura 5. Área de recolección de la especie *Piper ecuadorensis*

Fuente: Morocho (2015)

El Bosque Nativo de Washapamba, se ubica al sur del Ecuador en la zona alta del Cantón Saraguro, el mismo que se encuentra atravesado por la vía panamericana que conduce a Loja. Posee una diversidad de flora y fauna con diversas especies endémicas (ViajandoX, 2014).

La identificación botánica de la planta fue realizada por el Ing. Bolívar Merino, curador del Herbario de la Universidad Nacional de Loja. Una muestra botánica fue depositada en el Herbario de la UTPL bajo el código PPN-pi-007. En las siguientes fotografías se muestra a la especie *P. ecuadorensis* en su hábitat natural (Figura 6)



Figura 6. Muestra de *P. ecuadorensis* en su hábitat natural
Fuente: La autora

La especie fue recolectada en estado de foliación dentro de su hábitat natural; las recolecciones se realizaron en tres salidas de campo, desde noviembre hasta diciembre del 2013, en cada recolección se dividió la materia vegetal en tres partes con pesos iguales, obteniéndose así un total de 9 muestras. La materia vegetal fue transportada al laboratorio de Ingeniería de Procesos de la UTP para su tratamiento pos-cosecha, el cual consistió en seleccionar la materia vegetal que estaba en buenas condiciones, y eliminar la materia deteriorada e impurezas extrañas que podría interferir en posteriores resultados.

2.1.2. Determinación de la Humedad de la planta.

Se emplearon las hojas de *P. ecuadorensis* en estado fresco aproximadamente 1-2 gramos. Dicho método se realizó por triplicado con la finalidad de obtener resultados más confiables. Una vez finalizado todo el procedimiento se realizaron los cálculos respectivos para determinar la Humedad, por el método gravimétrico (Anexo I).

2.1.3. Extracción del aceite esencial.

Una vez realizado el tratamiento post-cosecha se procede a la obtención del aceite esencial por el método de destilación por arrastre de vapor. La extracción se llevó a cabo empleando un equipo de destilación (figura 7); que consta de un tanque de acero inoxidable, de una tapa del mismo material la cual se adapta al tanque obteniendo así un cierre hermético. Dentro del equipo se colocó el agua hasta topar el límite donde se ubica la placa perforada sobre la cual va la materia vegetal bien esparcida. Al tapar el tanque se colocaron las mangueras de entrada

y salida de agua del refrigerante así como el sello de agua en los bordes del destilador; continuamente el recipiente se expuso a una fuente de calor ubicada en la parte inferior.

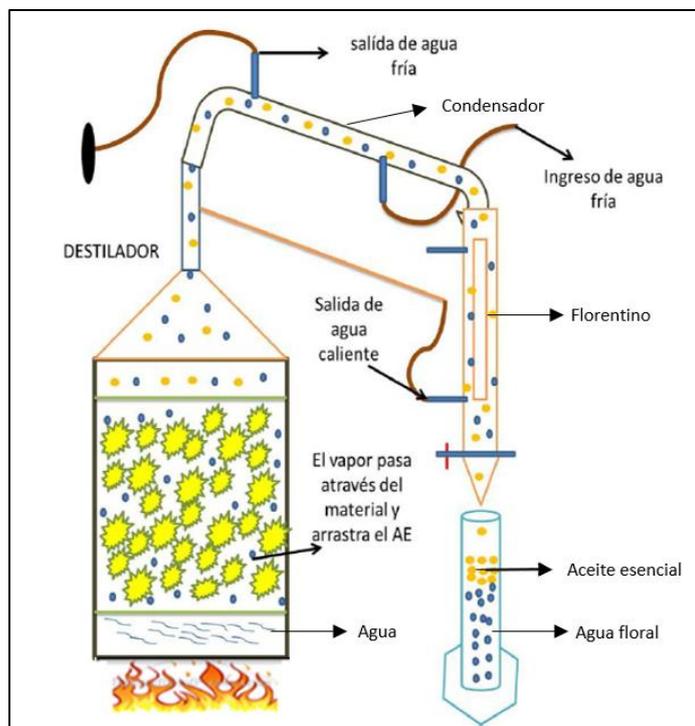


Figura 7. Proceso de destilación
Fuente: La autora

Conforme el vapor entra en contacto con la materia prima esta se calienta y va liberando el aceite esencial contenido, éste a su vez, al ser soluble en el vapor circundante, es “arrastrado” corriente arriba, fluye hacia el “cuello de cisne”, en el *condensador*, la mezcla es enfriada y condensada, y finalmente se obtiene una emulsión líquida inestable, la cual es recibida en un florentino en el que se produce la separación de agua y aceite por diferencia de densidades. El vapor condensado acompañante del aceite esencial y que también se obtiene en el *florentino*, es llamado “*agua floral*”, posee una pequeña concentración de los compuestos químicos solubles del aceite esencial, lo cual le otorga un ligero aroma, semejante al aceite obtenido (Rodríguez et al., 2012).

El proceso termina cuando el volumen del aceite esencial acumulado en el florentino no varíe con el tiempo de extracción. A continuación, el aceite fue recogido en una probeta para medir el volumen exacto, luego fue envasado en frascos ámbar con su respectivo código asignado, para evitar la degradación del aceite por la luz, y finalmente las muestras son almacenadas en refrigeración a -4°C .

Este proceso se realizó por triplicado, es decir se efectuaron tres destilaciones por cada recolección obteniéndose finalmente nueve muestras de aceite esencial.

2.1.3.1. **Determinación del rendimiento.**

El rendimiento del aceite esencial (%R) se determinó relacionando el volumen de aceite obtenido con la cantidad de materia vegetal utilizada como se muestra en la ecuación (1):

$$\%R = \frac{\text{Volumen (mL)}}{\text{Peso (gr.)}} * 100 \quad (1)$$

2.1.4. **Determinación de las propiedades físicas.**

2.1.4.1. **Densidad relativa.**

La densidad relativa se determinó según la norma ANFOR NFT75-111 (Anexo III), para ello se empleó materiales como: un picnómetro de vidrio de 2 mL, una balanza y un baño termostático

Se trabajó con las muestras obtenidas de la mezcla de las tres destilaciones realizadas por cada recolección, el primer paso a seguir es obtener el peso inicial del picnómetro vacío, seguido se registra el peso del picnómetro con agua y finalmente con el aceite esencial (figura 8: a, b y c). Para los valores obtenidos se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación.

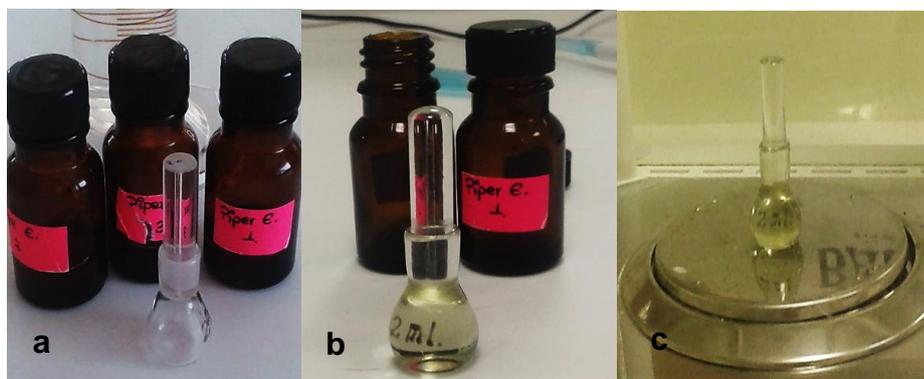


Figura 8. a) Picnómetro con agua b y c) Picnómetro con aceite
Fuente: La Autora

2.1.4.2. **Índice de Refracción.**

La determinación del índice de refracción se lo realizo en base a la norma ANFOR NF 75-112 25 (Anexo IV), empleando un refractómetro ABBE, marca BOECO GERMANY (Figura 9). Se obtuvo un valor promedio a partir de las muestras obtenidas de la mezcla de los tres aceites por cada recolección.



Figura 9. Refractómetro ABBE
Fuente: La Autora

2.1.5. Determinación de la composición química del aceite esencial.

La identificación de los componentes químicos del aceite esencial de *Piper ecuadorensis* se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas CG-EM y a un detector de ionización de llama CG-FID, con la finalidad de llevar a cabo el análisis cualitativo y cuantitativo respectivamente.

2.1.5.1. Análisis del aceite esencial por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y al detector de ionización en llama.

El análisis químico del aceite esencial se realizó en el cromatógrafo de gases de la serie Agilent 6890N acoplado a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973 inert; dotado de un sistema de datos “software MSD-Chemstation D.01.00 SP1”, que cuenta con un inyector automático split/splitless serie 7683, y un detector de ionización de llama (FID) provisto de un generador de hidrógeno “Gas Generator 9150 Packard” (Figura 10).



Figura 10. Cromatógrafo de gases
Fuente: La Autora

Para los análisis cromatográficos se emplearon dos tipos de columnas capilares: una no polar DB-5MS y una polar HP-INNOWAX de 30m x 0.25mm x 0.25µm, recubiertas internamente, la columna no polar de 5% - Fenilmetilpolisiloxano y la columna polar de Polietilenglicol.

2.1.5.1.1. Preparación de las muestras.

A cada muestra de aceite esencial previo a su análisis cromatográfico, se le realizó un tratamiento para eliminar completamente el agua que posiblemente quedó al momento de recolectar el aceite en los recipientes ámbar, con la finalidad de evitar problemas que puedan afectar al sistema cromatográfico.

Para ello se utilizó sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) en cantidades suficientes hasta observar que el aceite no contenga agua. Se dejó reposar por 30 minutos y se trasvaso a nuevos recipientes ámbar etiquetados. La preparación de las muestras para las corridas cromatográficas se realizó en viales previamente etiquetados en donde se colocaron 990 µl de diclorometano de grado HPLC y 10 µl de aceite esencial, obteniéndose una concentración al 1% (v/v) (Figura 11).

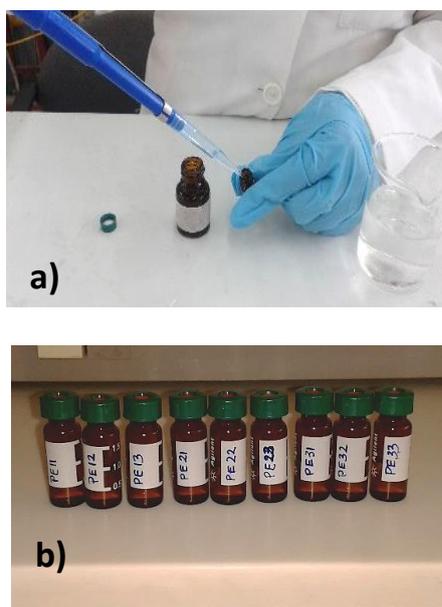


Figura 11. a) Preparación de las muestras para las corridas. **b)** Viales listo para la inyección.
Fuente: La Autora

Se realizó la inyección de hidrocarburos (C10decano a C25-pentacosano) conocidos comercialmente como TPH-6RPM de CHEM SERVICE, que fueron inyectados tanto en la columna DB-5MS como en HP-INOWAX, ya que el tiempo de retención de los hidrocarburos, nos sirve de base para la determinación de los índices de Kovats e identificación de cada uno de los compuestos, los Hidrocarburos se inyectaron bajo los mismos parámetros que los aceites.

2.1.5.1.2. **Corrida cromatográfica en la columna DB-5MS acoplada a espectrometría de masas.**

Las muestras tanto del aceite esencial de *P. ecuadorensis* como de los hidrocarburos fueron trabajadas bajo las condiciones operacionales expuestas en la figura 12.

HORNO: Programación de temperatura

- Temperatura inicial: 50°C
- Tiempo inicial: 3 minutos
- Rampa: 3°C/min
- Temperatura final: 230°C.

INYECTOR

- Modo: Split
- Radio de Partición: 50:1
- Temperatura inicial: 250°C
- Tipo de gas: Helio
- Volumen de inyección: 1 µL

COLUMNA

- DB-5MS
- Temperatura máxima: 350 °C.
- Modo: Flujo constante
- Flujo inicial: 0.9 mL/min.
- Presión inicial nominal: 6.49 psi
- Velocidad promedio: 35 cm/seg.
- Presión de salida: vacío

DETECTOR

- Temperatura: 250 °C.
- Gas: Nitrógeno

Figura 12. Condiciones operacionales para CG-EM en la columna DB-5MS.
Fuente: La autora.

2.1.5.1.3. **Corrida cromatográfica en la columna HP-INNOWAX acoplado a espectrometría de masas.**

En la figura 13, se muestran las condiciones operacionales bajo los cuales se inyectaron los hidrocarburos y las muestras en la columna polar HP-INNOWAX.

HORNO: Programación de la temperatura

- Temperatura inicial: 50°C
- Tiempo inicial: 3 minutos
- Rampa: 3°C/min
- Temperatura final: 230°C.

INYECTOR

- Modo: Split
- Radio de Partición: 50:1
- Temperatura inicial: 250°C
- Tipo de gas: Helio
- Volumen de inyección: 1 µL

COLUMNA

- HP-INNOWAX
- Temperatura máxima: 270 °C.
- Modo: Flujo constante
- Flujo inicial: 0.9 mL/min.
- Presión inicial nominal: 6.49 psi
- Velocidad promedio: 35 cm/seg.
- Presión de salida: vacío

DETECTOR

- Temperatura: 250 °C.
- Gas: Nitrógeno

Figura 13. Condiciones operacionales para CG-EM en la columna HP-INNOWAX
Fuente: La autora.

2.1.5.1.4. Identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos químicos del aceite esencial.

Para la obtención de los cromatogramas se procedió a integrar los compuestos a través de un sistema computarizado, sofisticado y completo (Chemstation Integrator-autoint1.e) propio del software del equipo para luego trabajar con los picos integrados, obteniendo un conjunto de compuestos a identificar.

Posteriormente se determinaron los índices de Kovats de los picos detectados, los cuales se calcularon por comparación de los tiempos de retención de los hidrocarburos (C₁₀-C₂₅) con relación al tiempo de retención de los compuestos aplicando la ecuación (2).

$$IK = 100n + 100 * \frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \quad (2)$$

Dónde:

IK: Índice de retención de Kovats;

n: Número de átomos de carbono en el n-alcano;

t_{RX}: Tiempo de retención del compuesto analizado, que eluye en el centro de n-alcanos;

t_{Rn}: Tiempo de retención n-alcano que eluye antes del compuesto analizado;

t_{RN}: Tiempo de retención del n-alcano que eluye después del compuesto analizado.

La identificación de los compuestos se realizó a partir de los índices de Kovats (IK) determinados experimentalmente en las corridas cromatográficas tanto en la columna polar como en la apolar, dichos valores se compararon con los reportados por Adams (2009), bases de datos electrónicas como Nist (National Institute of Standards and Technology), Taylor and Francis (revistas en línea de tres de las principales editoriales del mundo: Taylor & Francis, Prensa Routledge y Psicología), además de otros artículos de alta relevancia; de modo que la diferencia entre el IK calculado y el leído debe ser menor a 30 unidades.

Además se tomó en cuenta el número CAS que presenta cada componente, facilitando así la búsqueda e identificación de los IK de los constituyentes químicos del aceite esencial.

2.1.5.1.5. Corrida cromatográfica en la columna DB-5MS, acoplada al detector de ionización de llama (FID).

Para las corridas cromatográfica se inyectaron tanto los hidrocarburos como las muestras de aceite esencial de *P. ecuadorensis*. Las condiciones operacionales bajo los cuales se trabajó se indican en la Figura 14.

HORNO: Programación de la temperatura

- Temperatura inicial: 50°C
- Tiempo inicial: 3 minutos
- Temperatura final: 230°C.

INYECTOR

- Modo: Split
- Radio de Partición: 50:1
- Temperatura inicial: 250°C
- Tipo de gas: Helio
- Volumen de inyección: 1 µL

COLUMNA

- DB-5MS
- Temperatura máxima: 350 °C.
- Modo: Flujo constante
- Flujo inicial: 0.9 mL/min.
- Presión inicial nominal: 10.82 psi
- Velocidad promedio: 23 cm/seg.
- Presión de salida: ambiente

DETECTOR

- Ionización de llama
- Temperatura: 250 °C.
- Gas: Nitrógeno

Figura 14. Parámetros operacionales de la corrida cromatográfica en la columna DB-5MS acoplada al detector de ionización de llama (FID)

Fuente: La autora.

2.1.5.1.6. Corrida cromatográfica en la columna HP-INNOWAX, acoplada al detector de ionización de llama (FID).

En la figura 15, se muestran las condiciones operacionales bajo los cuales se inyectaron los hidrocarburos y las muestras en la columna polar HP-INNOWAX

HORNO: Programación de la temperatura

- Temperatura inicial: 50°C
- Tiempo inicial: 1 minuto
- Temperatura final: 210°C.

INYECTOR

- Modo: Split
- Radio de Partición: 50:1
- Temperatura inicial: 250°C
- Tipo de gas: Helio
- Volumen de inyección: 1 µL

COLUMNA

- HP-INNOWAX
- Temperatura máxima: 270 °C.
- Modo: Flujo constante
- Flujo inicial: 0.9 mL/min.
- Presión inicial nominal: 11.37 psi
- Velocidad promedio: 24 cm/seg.
- Presión de salida: ambiente

DETECTOR

- Ionizador de llama
- Temperatura: 250 °C.
- Gas: Nitrógeno

Figura 15. Parámetros operacionales de la corrida cromatográfica en la columna HP-INNOWAX acoplada al detector de ionización de llama (FID)

Fuente: La autora.

2.1.5.1.7. Identificación de los compuestos químicos mediante CG-FID.

Una vez obtenidos los cromatogramas se tomó en cuenta el tiempo de retención y el área de pico de cada uno de los compuestos químicos detectados en FID y se ajustaron al tiempo de retención de los compuestos detectados en masas a través de la ecuación que resulta de la gráfica que relaciona los tiempos de retención de los hidrocarburos en FID y en masas.

2.1.6. Determinación de la actividad biológica del aceite esencial.

Para la determinación de la actividad biológica del aceite esencial de *P. ecuadorensis* se empleó el método de microdilución en caldo que evalúa la concentración mínima inhibitoria (CMI), frente a diferentes cepas bacterianas y fúngicas (Beltrán et al., 2013).

2.1.6.1. Cepas bacterianas y fúngicas.

Se utilizaron 9 microorganismos patógenos de interés clínico humano; siete cepas bacterianas y dos cepas fúngicas, los cuales se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC). En la tabla 1 se detallan los microorganismos de prueba.

Tabla 1. Microorganismos de prueba.

MICROORGANISMOS EMPLEADOS		
Bacterias Gram-negativas	Bacterias Gram-positivas	Hongos
* <i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	* <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	* <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 28185
* <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 9997	* <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	* <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188
* <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427		
* <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		
* <i>Salmonella typhimurium</i> LT2		

Fuente: American Type Culture Collection

2.1.6.2. Actividad antibacteriana.

Para la evaluación de la actividad antibacteriana por el método de microdilución en caldo determinando la CMI, la cual se define como como la mínima concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento posible de un inóculo bacteriano estandarizado (Herrera, 1999).

2.1.6.2.1. Método de microdilución en caldo.

Este método se denomina microdilución porque involucra pequeños volúmenes de los materiales empleados. La prueba se realiza en microplacas de plástico estériles de fondo cónico o redondo, de 96 pozos, en los cuales se realizan diluciones seriadas.

2.1.6.2.2. Preparación de la muestra.

La muestra de aceite esencial que se va a utilizar en este ensayo, fue diluida. Para ello se colocó en un vial previamente etiquetado 20 µL del aceite esencial y se adicionaron 980 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO). Cabe mencionar que esta dilución fue utilizada tanto para bacterias como para hongos.

2.1.6.2.3. Preparación del cultivo bacteriano, "Cultivo Overnight".

Para la preparación del inóculo bacteriano, se realizó primeramente los caldos de cultivo específicos para cada cepa bacteriana. Para la siembra en el caldo de cultivo específico, se utilizaron 30 µL de cada cepa bacteriana, que se encontraban almacenadas en una reserva criogénica a -80°C. Posteriormente a realizar la siembra de cada cepa, se incuban los medios por 14-16 horas a 37°C, por esta razón el cultivo se denomina overnight. Las condiciones necesarias para el crecimiento de cada bacteria y los medios de cultivo necesarios se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Medios de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada bacteria.

BACTERIAS	MEDIO DE CULTIVO	CONDICIONES DE INCUBACIÓN
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Caldo Trypticasa Soya	Temperatura: 37°C Tiempo: 14-16 horas
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Caldo Trypticasa Soya	
<i>Proteus vulgaris</i>	Caldo Mueller Hinton	
<i>Escherichia coli</i>	Caldo Trypticasa Soya	
<i>Salmonella typhimurium</i>	Caldo Nutritivo Oxoid	
<i>Enterococcus faecalis</i>	Caldo Infusión Cerebro-Corazón	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo Trypticasa Soya	

Fuente: American Type Culture Collection.

2.1.6.2.4. Preparación de la suspensión del inóculo bacteriano.

Del cultivo overnight incubado durante la noche, se transfirieron 150-300 µL a un tubo que contenía 7 mL de suero fisiológico estéril ajustando el inóculo a una concentración equivalente a 0,5 en la escala de MacFarland.

De la suspensión anterior se tomaron 140 µL y se inoculó en 6,86 mL de Caldo Mueller Hinton, ajustando a una población bacteriana de 2×10^6 ufc/mL. De esta solución resultante se transfirieron 100 µL a la placa de cultivo para completar un volumen final de 200 µL, de esta manera en cada pocillo la concentración bacteriana final fue de 5×10^5 ufc/mL.

2.1.6.2.5. Procedimiento.

El análisis del aceite, se realizó en una cabina de seguridad, previamente limpia y esterilizada para evitar contaminaciones. La prueba se realizó en microplacas de 96 pocillos empleando el procedimiento de dilución doble seriada: del caldo Mueller Hinton se transfirió 180 µL a cada pocillo de la primera fila, y 100 µL a los pocillos restantes, luego se adicionaron 20 µL de la solución de aceite diluido a cada pocillo de la primera fila excepto a los tres últimos pocillos, los cuales contendrán: 1) como control de esterilidad (200 µL de caldo Mueller Hinton). 2) control negativo (180 µL caldo Muller Hinton + 20 µL DMSO) y 3) como control positivo (180 µL caldo Muller Hinton + 20 µL de Gentamicina de 0,39 µg/mL para todas las bacterias utilizadas a excepción de *Enterococcus faecalis faecalis* y *S. tiphymurium* para la cual se empleó Gentamicina de 1,95 µg/mL)

Para lograr una homogenización correcta del medio y la solución de aceite, se pipeteó de 15 a 20 veces la solución de todos los pocillos de la primera fila del cual se tomaron 100 µL de la solución homogénea y se diluyeron con 100 µL del pocillo siguiente se mezcló correctamente y se continuó este procedimiento hasta obtener 8 diluciones consecutivas; en la última fila de la placa se desecharon los 100 µL sobrantes, así la concentración final de la solución de medio y aceite contenida en cada uno de los pocillos fue de 1000 a 7,81 µg/mL (Figura 16). El mismo procedimiento fue aplicado para el control positivo, negativo y de esterilidad.

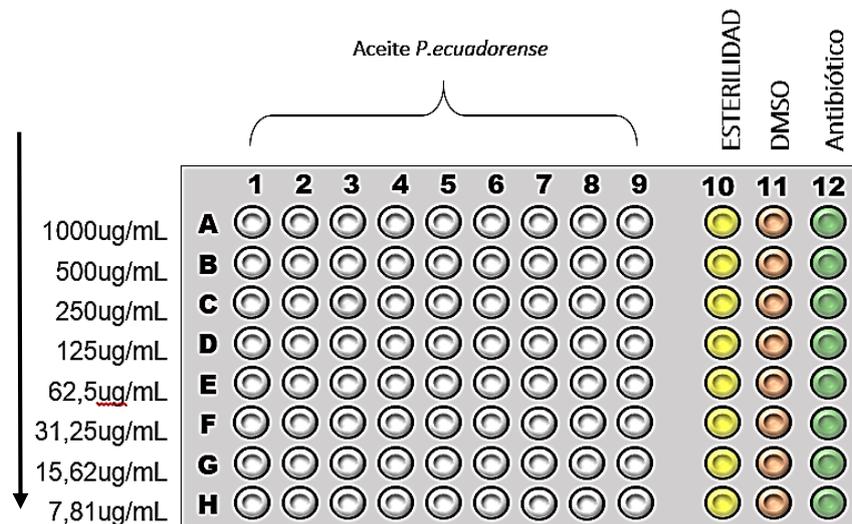


Figura 16. Modelo de Microplaca TC96 para bacterias con las concentraciones del aceite (µg/mL).
Fuente: La Autora

Finalmente ya preparada la placa de microdilución se inoculó con 100 µL de la suspensión del inóculo bacteriano en todos los pocillos, excepto en los pocillos en los que se coloca los controles de esterilidad, control positivo y negativo; completando así un volumen final de 200

μL , ajustando la población bacteriana a 5×10^5 ufc/mL. Al concluir la inoculación, las placas se sellaron con parafilm y fueron incubadas a 37°C de 18-24 h.

2.1.6.3. Actividad antifúngica.

2.1.6.3.1. Preparación de la muestra.

Se preparó una solución de aceite diluido, tomando $980 \mu\text{L}$ de DMSO (Dimetilsulfóxido) y $20 \mu\text{L}$ del aceite esencial de *P. ecuadorensis*.

2.1.6.3.2. Preparación de la suspensión de los inóculos fúngicos.

La suspensión del inóculo fúngico se realizó a partir de cepas almacenadas en una reserva criogénica mantenidas a -80°C . De dicha reserva se tomaron $14 \mu\text{L}$ en 7ml de Caldo Sabouraud, de esta suspensión se tomó $100 \mu\text{L}$ para completar a $200 \mu\text{L}$ el volumen final de la placa de cultivo, de esta manera se ajustó la población fúngica a 5×10^4 esporas/mL.

Las condiciones mínimas necesarias para el crecimiento fúngico se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Medios de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada hongo

HONGO	MEDIO DE CULTIVO	CONDICIONES
<ul style="list-style-type: none"><i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 28185<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 2818	Caldo Sabouraud	Temperatura: 28°C Tiempo de incubación: 72 -96 horas.

Fuente: American Type Culture Collection.

2.1.6.3.3. Procedimiento.

Se empleó el mismo procedimiento de dilución seriada utilizado para las bacterias, diferenciándose en la concentración final del inóculo, en hongos esporulados de 5×10^4 esporas/mL, y los controles; el de esterilidad, que contiene $200 \mu\text{L}$ de caldo Sabouraud, el control negativo que consta de $180 \mu\text{L}$ de caldo Sabouraud + $20 \mu\text{L}$ de DMSO y el positivo que es una solución de $180 \mu\text{L}$ de caldo Sabouraud más $20 \mu\text{L}$ de Itraconazol de 1mg/mL y finalmente cuando las placas de microdilución están inoculadas totalmente, son selladas con parafilm y se incuban a 28°C por 96 horas.

2.1.6.3.4. Lectura de las placas de concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana y antifúngica e interpretación de los resultados.

Una vez retiradas las placas de microdilución de la incubadora, se examinó detalladamente cada caja utilizando luz reflejada, empezando por el control de esterilidad para descartar

cualquier tipo de contaminación, en caso de que la placa se muestre contaminada, la prueba no puede ser interpretada y debe ser repetida (Figura 17).

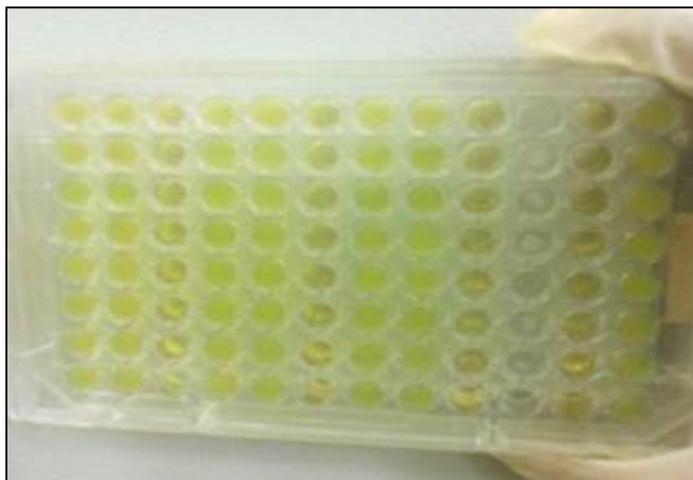


Figura 17. Microplaca previa a la lectura de la CMI antibacterial
Fuente: La Autora

Por otro lado se revisó el control negativo el cual nos indicó que si hubo un crecimiento adecuado, ya sea de las bacterias o los hongos en la placa de microdilución. El crecimiento en este pocillo se notó como turbidez o un pellet de $> 2\text{mm}$. Y finalmente se observó el control positivo en el cual no se evidencio ningún rastro de crecimiento, por el contrario estuvo claro y sin turbidez.

Para determinar en qué punto se encontró la concentración mínima inhibitoria de una muestra, es decir la concentración más baja a la que el aceite puede actuar como antimicrobiano, se leyó el pocillo en el cual se distinguió turbidez del medio. Es un proceso manual sin ayuda de ningún aparato óptico.

2.1.7. Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial.

La actividad antioxidante del aceite esencial de *Piper ecuadorensis* se evaluó mediante el empleo de dos métodos espectrofotométricos basados en la capacidad captadora del catión radical ABTS^+ Arnao et al. (2001), y del radical libre DPPH Brand-Williams et al. (1995). A dichos métodos se les realizó algunas modificaciones en lo que respecta al procedimiento, específicamente a las concentraciones de las muestras y el empleo de dos estándares de referencia “Trolox y Butilhidroxitolueno (BHT)” con la finalidad de comparar la actividad antioxidante de las muestras frente a ellos (Kuskoski et al., 2005).

Para el análisis de la actividad antioxidante se determinó el porcentaje de disminución de cada uno de los radicales frente a cada una de las concentraciones tanto del aceite como de los estándares, para ello se utilizó un espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS Scanning 333907

(Figura 18). Las longitudes de onda empleadas en cada método fueron 734nm y 515nm respectivamente.



Figura 18. Espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS Scanning 333907
Fuente: La autora

2.1.7.1. Preparación de las muestras.

Para realizar el análisis de la muestra mediante los métodos mencionados, se trabajó con 5mg de aceite esencial del cual se procedió a realizar las respectivas diluciones, la primera dilución se empezó de una concentración máxima de 1000 ppm, hasta llegar a una concentración mínima final de 5 ppm, ya que la concentración de 0ppm solo lleva metanol.

Los volúmenes respectivos de cada dilución fueron los necesarios para analizar cada muestra por triplicado. En la tabla 4, se explica cómo se realizó cada dilución, cabe destacar que el volumen final de cada dilución es de 5000 μ L.

Tabla 4. Volumen necesario para cada dilución en aceite.

Volumen necesario para cada dilución.	
Concentración	Volumen de cada dilución
Concentración 1 (1000 ppm)	5000 μ L MeOH + 5 mg de aceite esencial
Concentración 2 (500 ppm)	2500 μ L MeOH + 2500 μ L de concentración 1
Concentración 3 (100 ppm)	4000 μ L MeOH + 1000 μ L de concentración 2
Concentración 4 (50 ppm)	2500 μ L MeOH + 2500 μ L de concentración 3
Concentración 5 (25 ppm)	2500 μ L MeOH + 2500 μ L de concentración 4
Concentración 6 (12,5 ppm)	2500 μ L MeOH + 2500 μ L de concentración 5
Concentración 7 (5 ppm)	3000 μ L MeOH + 2000 μ L de concentración 6
Concentración 8 (0 ppm)	5000 μ L MeOH

Fuente: Investigación Experimental.

2.1.7.2. Método ABTS⁺.

Se empleó la metodología descrita por Arnao et al. (2001) con modificaciones de Thaipong et al. (2006). El método se basa en la capacidad de diferentes compuestos para atrapar el radical catión ABTS⁺, el cual es idóneo para determinar la capacidad antioxidante de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica (Kuskoski et al., 2005).

El radical catiónico de color verde azulado, se genera por la interacción del ABTS con persulfato de potasio. Se evalúa la capacidad antioxidante de la muestra en función de la habilidad para disminuir la concentración del radical, es decir el grado de decoloración que se cuantifica midiendo la reducción de la absorbancia a una longitud de onda de 734nm (Pérez et al., 2013).

2.1.7.2.1. Solución patrón y de trabajo de ABTS⁺.

Para realizar la solución patrón se pesó 40,6 mg de ABTS⁺ y 7,028 mg de persulfato de potasio (K₂S₂O₈), luego se aforó cada uno de los reactivos a 10 mL con agua destilada. Se mezclaron y se dejó reaccionar durante 12 horas a temperatura ambiente en la oscuridad.

Transcurridas las 12 horas de reacción, se tomó de esta solución una alícuota de 1mL añadida a 60mL de metanol, hasta obtener una absorbancia de $1,1 \pm 0,02$ a 734nm. Si la lectura de la absorbancia es menor al resultado que desea obtener se añade más solución de trabajo, si por el contrario la lectura es mayor a la esperada se debe añadir metanol. Previo a lectura de la absorbancia de la solución de trabajo se procedió a encerrar el equipo con metanol.

2.1.7.2.2. Estándar Trolox y BHT para ABTS⁺.

Para realizar la solución estándar se utilizó Trolox o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico y el hidrotolueno butilado (BHT), los cuáles son patrones de referencia utilizados para expresar la actividad antioxidante del aceite esencial como TEAC que es la capacidad antioxidante equivalente a Trolox.

Se pesó 25 mg de Trolox y 22 mg de BHT se aforó a 100 mL de metanol. En la tabla 5, se explica cómo se realizó cada dilución, cabe destacar que el volumen final de cada una es de 5000 μ L. Se tomó 150 μ L de cada dilución y 2850 μ L de la solución de trabajo dejando reaccionar por 2 horas en la oscuridad, transcurrido ese tiempo se procedió a leer la absorbancia a 734nm. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada concentración de Trolox y BHT.

Tabla 5. Volumen necesario para cada dilución en Trolox y BHT.

Concentración	Volumen de cada dilución
Concentración 1 (1000 μM)	5000 μL Trolox/BHT
Concentración 2 (800 μM)	1000 μL MeOH + 4000 μL de concentración 1
Concentración 3 (600 μM)	1250 μL MeOH + 3750 μL de concentración 2
Concentración 4 (450 μM)	1250 μL MeOH + 3750 μL de concentración 3
Concentración 5 (300 μM)	1670 μL MeOH + 3330 μL de concentración 4
Concentración 6 (150 μM)	2500 μL MeOH + 2500 μL de concentración 5
Concentración 7 (25 μM)	4170 μL MeOH + 830 μL de concentración 6
Concentración 8 (0 μM)	5000 μL MeOH

Fuente: Investigación Experimental

2.1.7.2.3. Lectura de las muestras.

Para determinar si el aceite esencial posee capacidad antioxidante, se debe evaluar cada muestra con suma precisión, tanto para cada dilución que se realizó como para cada alícuota de Trolox y BHT. Con ayuda del espectrofotómetro se procedió a la lectura de las muestras, las mismas que se cuantificaron midiendo la absorbancia a 734nm. (Figura 25)

Se anotaron los datos y se calculó el porcentaje de inhibición de dicho radical (% Inh) usando la ecuación (Figura 19).



Figura 19. Muestras del aceite de *P. ecuadorensis*, analizadas mediante el método ABTS⁺.
Fuente: Investigación Experimental.

2.1.7.3. Método DPPH.

Se realizó en base a la técnica descrita por Brand-Williams et al. (1995), con modificaciones de. Se basa en la reducción del radical libre estable, 2,2 – difenil picril hidrazilo, mediante la captación de un átomo de hidrógeno que dona el antioxidante (compuesto químico puro o extracto). La disminución de la concentración del radical libre, se desarrolla un cambio de color

violeta a un amarillo. La decoloración del radical se determina a 515nm y la cuantificación se realiza por lo general, empleando soluciones patrón de Trolox y BHT (Muedas et al., 2008; Segovia et al., 2014).

2.1.7.3.1. Solución patrón y de trabajo para DPPH.

La solución patrón se realizó pesando 24 mg de reactivo de DPPH y se aforó a 100 mL de metanol, la misma fue almacenada a -4°C hasta su uso, de esta solución se tomó 10 mL y se adicionó 45 mL de metanol obteniéndose la solución de trabajo; se midió la absorbancia a una longitud de onda de 515nm ajustándose hasta obtener una lectura de $1,1 \pm 0,02$. Si la lectura de la absorbancia es mayor se ajusta añadiendo metanol y si por el contrario es menor se ajusta añadiendo más solución de trabajo.

2.1.7.3.2. Estándar Trolox y BHT para DPPH.

Como ya se mencionó previamente Trolox y BHT fueron utilizados como el estándar de referencia para determinar la capacidad antioxidante del aceite esencial para ambos métodos.

2.1.7.3.3. Lectura de las muestras.

Al igual que la parte experimental del método de ABTS+, en este método también se utilizó las mismas diluciones a diferentes concentraciones del aceite esencial (ver tabla 4) de y diferentes concentraciones del estándar Trolox y BHT (ver tabla 5).

Cabe destacar que la parte experimental se realizó por triplicado de cada muestra diluida. Las muestras se dejan reaccionar por 24 horas en la oscuridad y posteriormente se procedió a la lectura de las muestras a una absorbancia de 515nm (Figura 20).



Figura 20. Muestras del aceite de *P. ecuadorensis* analizadas mediante el método DPPH
Fuente: Investigación Experimental

2.1.7.4. Análisis de los datos obtenidos mediante ABTS⁺ y DPPH.

Las absorbancias determinadas mediante el método ABTS⁺ y DPPH, de cada muestra de aceite esencial evaluada a diferentes concentraciones, permiten calcular el porcentaje de inhibición empleando la fórmula de la ecuación (3).

$$\% Dis. = \left\{ \left(\frac{Abs.blanco - Abs.muestra}{Abs.blanco} \right) * 100 \right\} \quad (3)$$

Donde:

Abs. blanco: absorbancia de la solución de trabajo

Abs. muestra: absorbancia de la respectiva concentración

En ambos métodos (ABTS⁺ y DPPH) se utilizó como estándar el Trolox y BHT, cuya capacidad antioxidante se evaluó en las mismas condiciones de trabajo de las muestras.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. Humedad de *Piper ecuadorensis*

El porcentaje de humedad de la materia vegetal se expone en la tabla 6, en la que se observa el valor de la media del porcentaje de humedad de la materia vegetal por recolección, la desviación estándar y coeficiente de variación.

Tabla 6. Porcentaje de Humedad de la materia vegetal.

Recolección	HUMEDAD			
	H (%)	\bar{X}	σ	CV
PE1	67	66	3,61	0,05
PE2	62			
PE3	69			

PE: *Piper ecuadorensis*: **1** Primera recolección; **2** Segunda recolección; **3** Tercera Recolección.
H(%): Humedad promedio por cada recolección
 \bar{X} : promedio de todas las recolecciones
 σ : Desviación estándar
CV: Coeficiente de variación

Fuente: La autora

La materia vegetal recolectada tuvo una humedad promedio de 66%, sin embargo se puede apreciar que existe una pequeña variación entre ellas. Esta variabilidad se puede atribuir a varias condiciones que pueden influir en los resultados como: las condiciones climáticas, la cantidad de vapor de agua en el aire, la temperatura del ambiente, el suelo, los nutrientes, desarrollo de la planta al momento de la recolección, el lugar (Margulis & Sagan, 2012).

Estos valores de humedad están en concordancia con lo presentado en la literatura, ya que el contenido de humedad en las plantas frescas varía de 60% a 80% (Sharapin, 2000).

3.2. Rendimiento de *Piper ecuadorensis*

El rendimiento obtenido del aceite esencial de *Piper ecuadorensis* se detalla en la tabla 7, en la que se indica el porcentaje de rendimiento medio para cada recolección, que resulta de la media de las tres repeticiones. Además se expone un promedio general, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Tabla 7. Porcentaje de rendimiento de la materia vegetal.

		RENDIMIENTO		
Recolección	R (%)	\bar{X}	σ	CV
PE1	0,20	0,23	0,03	0,12
PE2	0,25			
PE3	0,24			

PE: *Piper ecuadorensis*: **1** Primera recolección; **2** Segunda recolección; **3** Tercera Recolección.
R (%): Rendimiento promedio por cada recolección
 \bar{X} : promedio de todas las recolecciones
 σ : Desviación estándar
CV: Coeficiente de variación

Fuente: La autora

De los porcentajes de rendimiento expuestos en la tabla anterior, se observa que el rendimiento más bajo obtenido fue de 0,20% a partir de 5,453 Kg de materia vegetal con un volumen de 11 mL de aceite, y el rendimiento más alto fue de 0,25 a partir de 3.98 kg con 10 mL de aceite esencial. Existen diferentes factores por los cuales se ve afectado el rendimiento de los aceites esenciales, tales como el origen, especie y órgano de la planta, condiciones climáticas y de crecimiento (temperatura, fertilizantes, suelo), manejo y almacenamiento del material vegetal, método de obtención del aceite entre otros factores (Ochoa et al., 2012; Pino, O. et al., 2012).

Según la categorización propuesta por el organismo de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) citada por Molares et al. (2009), los valores de rendimiento menores a 5 mL/kg los considera bajos, valores entre 5 mL/kg y 10 mL/kg intermedios, y valores superiores a 10 mL/kg altos. De acuerdo a esta clasificación el porcentaje de rendimiento del aceite de *P. ecuadorensis* es bajo. La determinación del rendimiento es utilizada como un criterio para la selección de especies aromáticas potencialmente comercializables, sin embargo la misma debe analizarse en conjunto con otras características del aceite esencial, como la originalidad del aroma, composición química y efectos farmacológicos.

Sánchez et al. (2011) plantea que los aceites esenciales con más de 1% de rendimiento se pueden obtener en cantidades suficientes para su comercialización a gran escala. Teniendo en cuenta también este criterio, el aceite evaluado tiene muy pocas potencialidades para el desarrollo de un producto cuya obtención sea económicamente factible, por el bajo valor del rendimiento obtenido.

3.3. Propiedades físicas

El aceite esencial obtenido de *P. ecuadorensis* resulto ser un sólido viscoso ligeramente amarillento. Para definir la calidad de un aceite esencial se determinan las siguientes constantes físicas entre ellas tenemos densidad relativa e índice de refracción.

3.3.1. Densidad relativa.

En la tabla 8 se detallan los valores de la densidad promedio de las tres destilaciones que se realizaron por cada recolección, obteniéndose un promedio final de 0,9269 g/cm³.

Tabla 8. Densidad relativa del aceite esencial de *Piper ecuadorensis*.

Recolección	Densidad (g/cm ³)	\bar{X} (g/cm ³)
PE1	0,9259	0,9269
PE2	0,9270	
PE3	0,9280	

PE: *Piper ecuadorensis*; **PE1:** Primera recolección; **PE2:** Segunda recolección; **PE3:** Tercera recolección; \bar{X} : promedio de todas las recolecciones.

Fuente: La autora

La determinación de la densidad tiene interés por encontrarse siempre citada en literaturas afines, ayudando a definir en lo que respecta la calidad del aceite extraído (Ochoa et al., 2012). De acuerdo a estudios, la gran mayoría de los aceites son menos densos que el agua (1,00 g/cm³). Esta diferencia de densidades y la diferencia de polaridades es lo que permitió la separación del aceite esencial del agua después de la destilación.

3.3.2. Índice de refracción.

El índice de refracción es una propiedad utilizada para controlar la pureza y la calidad de los aceites tanto a nivel laboratorio como industrial además que su determinación puede señalar adulteraciones y envejecimientos de los aceites.

En la tablas 9 se detallan los valores de los índices de refracción que corresponden a la media de las tres destilaciones obtenidas por cada recolección realizada.

Tabla 9. Índice de refracción del aceite esencial de *Piper ecuadorensis*.

Recolecciones	Índice de refracción (nD)	\bar{X}	σ	CV
PE1	1,5024	1,5043	0,002	0,001
PE2	1,5056			
PE3	1,5049			

PE: *Piper Ecuadorensis*; **PE1** Primera recolección; **PE2** Segunda recolección; **PE3** Tercera recolección
 \bar{X} : Promedio de todas las recolecciones
 σ : Desviación estándar
CV: Coeficiente de variación

Fuente: La autora

El promedio general de los índices de refracción de las muestras de aceite esencial fue 1,5043. Este parámetro es característico de cada aceite y que cambia si este se diluye o se mezcla con otras sustancias.

3.4. Composición química del aceite esencial de *Piper ecuadorensis*

3.4.1. Análisis cualitativo y cuantitativo.

En la figura 21, se observa el perfil cromatográfico obtenido en la columna no polar DB-5MS y en la figura 22 en columna polar HP-INNOWAX mediante la técnica de CG-EM acorde a los parámetros operacionales descritos en la metodología.

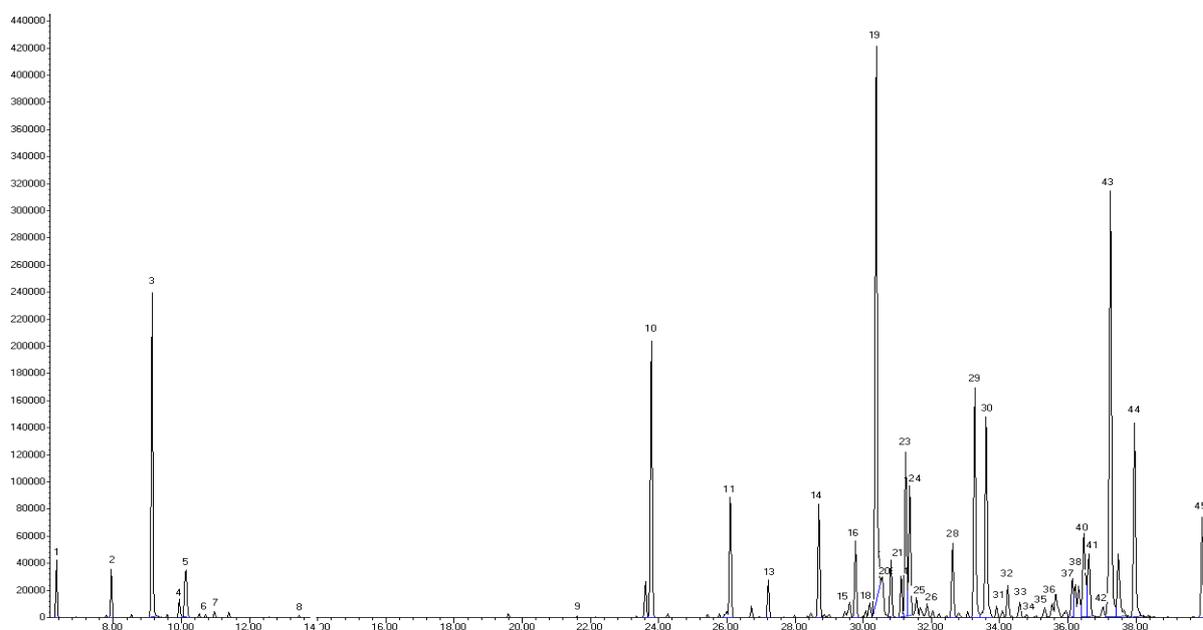


Figura 21. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *P. ecuadorensis* obtenido en la columna DB-5MS
Fuente: Investigación Experimental

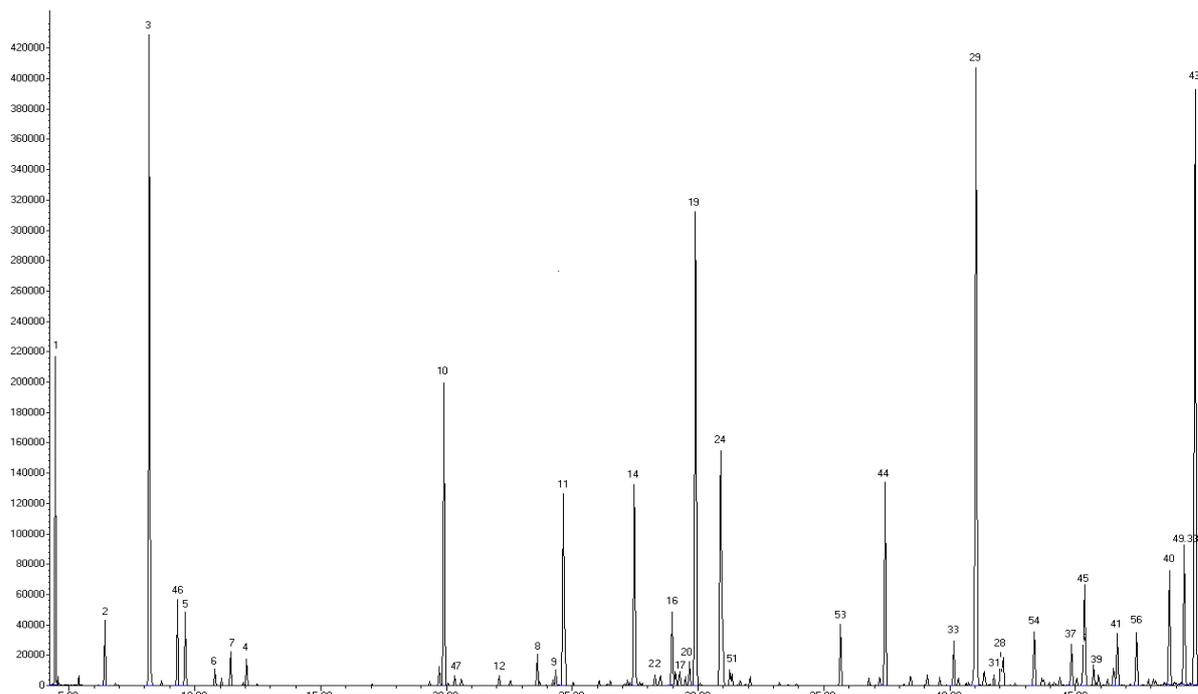


Figura 22. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *P. ecuadorensis* obtenido en la columna HP-INNOWAX.

Fuente: Investigación Experimental

Los cromatogramas obtenidos muestran diferentes picos que corresponden a cada uno de los compuestos volátiles emitidos (Figura 31). Cada uno de los cromatogramas presenta varios picos, algunos de ellos muy próximos o superpuestos, resultando difícil la identificación rápida y fiable de los compuestos de interés, de modo que se procedió a la integración de cada uno de ellos.

En el análisis cualitativo, la identificación de los componentes volátiles se la realizó comparando los índices de Kovats (IK) para los compuestos analizados determinados en las dos columnas (polar y apolar), frente a los IK reportados en la literatura. Además cada compuesto detectado posee su respectivo espectro de masas el cual fue comparado con los espectros que proporciona la base de datos del equipo biblioteca Wiley 7n.

En la Tabla 10, se detallan los compuestos químicos que se identificaron en el aceite esencial de *P. ecuadorensis* en las columnas DB-5ms y HP-INNOWAX; los mismos que están dispuestos de acuerdo al orden de elución en la columna DB-5ms, resaltando los compuestos con mayores áreas.

Se indican también los IK calculados y los reportados en la literatura; el porcentaje promedio relativo para cada compuesto correspondiente a cada una de las destilaciones, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Tabla 10. Composición química de *Piper ecuadorensis*

Nº	COMPUESTOS	DB5 - MS								HPINOWAX - MS							
		IK ^{cal}	IK ^{ref}	% de Cantidad Relativa ^a			\bar{X}	O'	C.V.	IK ^{cal}	IK ^{ref}	% de Cantidad Relativa ^a			\bar{X}	O'	C.V.
				PE1	PE2	PE3						PE1	PE2	PE3			
1	α -Pinene	933	932 ^b	2,20	1,01	0,85	1,35	0,74	0,54	1035	1032 ^c	2,56	1,09	0,98	1,54	0,88	0,57
2	β -Pinene	973	974 ^b	0,72	0,57	0,65	0,65	0,08	0,12	1101	1105 ^d	0,86	0,65	0,76	0,76	0,11	0,14
3	α -Phellandrene	1003	1002 ^b	8,03	6,64	6,01	6,89	1,03	0,15	1158	1160 ^d	8,80	6,92	6,33	7,35	1,29	0,18
4	P- Cymene	1021	1020 ^b	0,37	0,33	0,35	0,03	0,08	1269	1269 ^e	0,61	0,31	0,58	0,50	0,17	0,33
5	β -Phellandrene	1025	1025 ^b	2,11	1,63	1,52	1,75	0,31	0,18	1204	1200 ^f	1,12	0,86	0,79	0,93	0,17	0,19
6	(Z)- β -Ocimene	1034	1032 ^b	0,18	1235	1239 ^g	0,22	0,19	0,21	0,02	0,10
7	(E)- β -ocimene	1044	1044 ^b	0,33	0,25	0,29	0,05	0,19	1252	1250 ^h	0,45	0,23	0,33	0,34	0,11	0,33
8	Linalool	1101	1095 ^b	0,34	1559	1553 ⁱ	0,57	0,46	0,51	0,08	0,16
9	Bornyl acetate	1280	1284 ^b	0,22	1578	1578 ^j	0,28	0,20	0,24	0,05	0,22
10	δ -Elemene	1329	1335 ^b	6,34	7,81	6,35	6,83	0,85	0,12	1466	1468 ^e	5,97	7,55	5,77	6,43	0,97	0,15
11	β - Elemene	1383	1389 ^b	3,32	4,41	2,95	3,56	0,76	0,21	1586	1585 ^d	4,44	6,01	4,02	4,82	1,05	0,22
12	α -Gurjunene	1397	1409 ^b	0,30	0,20	0,25	0,07	0,28	1521	1518 ^k	0,31	0,20	0,25	0,08	0,30
13	(E)- β -Caryophyllene	1409	1417 ^b	0,87	1,28	0,85	1,00	0,24	0,24
14	α -Humulene	1445	1452 ^b	2,98	3,79	2,83	3,20	0,51	0,16	1660	1664 ^d	3,20	4,12	3,16	3,49	0,54	0,15
15	γ -Muurolene	1467	1478 ^b	0,48	0,60	0,56	0,55	0,06	0,11	1755	1734 ^f	0,98
16	Germacrene-D	1471	1484 ^b	1,36	2,08	1,67	1,70	0,36	0,21	1699	1693 ^l	1,47	2,27	1,79	1,84	0,40	0,22
17	β -Selinene	1479	1489 ^b	0,26	0,41	0,23	0,30	0,10	0,32	1708	1715 ^e	0,32	0,40	0,30	0,34	0,05	0,15
18	trans-Muurola-4(14),5-diene	1482	1493 ^b	0,50	0,43	0,47	0,46	0,03	0,07
19	Bicyclogermacrene	1486	1494 ^b	10,71	13,45	14,77	12,98	2,07	0,16	1725	1737 ^j	9,75	12,50	13,24	11,83	1,84	0,16
20	α -Muurolene	1490	1500 ^b	2,16	2,04	1,97	2,06	0,10	0,05	1719	1723 ^e	0,60	0,66	0,72	0,66	0,06	0,08
21	Germacrene-A	1497	1508 ^b	1,73	2,10	1,44	1,76	0,33	0,19
22	α -Amorphene	1504	1484 ^b	1,18	1,21	1,23	1,21	0,02	0,02	1681	1682 ^m	0,29	0,34	0,35	0,33	0,03	0,10
23	γ -Cadinene	1507	1513 ^b	3,35	1,98	3,36	2,90	0,79	0,27
24	δ -Cadinene	1511	1522 ^b	3,71	3,76	4,09	3,85	0,21	0,05	1752	1755 ^e	7,18	8,14	7,78	7,70	0,49	0,06
25	α -Chamigrene	1516	1503 ^b	0,58	0,60	0,52	0,57	0,04	0,07
26	α -Alaskene	1524	1512 ^b	0,37	0,31	0,33	0,34	0,03	0,09
27	α -Cadinene	1528	1537 ^b	0,21	0,24	0,23	0,02	0,09	1785	1785 ^d	0,22
28	Elemol	1543	1548 ^b	0,95	0,77	1,56	1,09	0,41	0,37	2086	2077 ⁿ	1,18	1,02	1,87	1,35	0,45	0,33
29	E-Nerolidol	1560	1561 ^b	8,56	5,53	6,54	6,88	1,54	0,22	2052	2053 ^d	14,02	10,43	12,09	12,18	1,79	0,15
30	Germacrene-D-4-ol	1568	1574 ^b	5,25	4,33	5,54	5,04	0,64	0,13
31	Globulol	1576	1590 ^b	0,29	0,25	0,31	0,28	0,03	0,11	2074	2063 ^f	0,20	0,24	0,22	0,22	0,02	0,09
32	Viridiflorol	1584	1592 ^b	0,93	0,75	0,95	0,88	0,11	0,13	2083	2069 ^f	0,64	0,70	0,65	0,67	0,03	0,05
33	Ledol	1593	1602 ^b	0,65	0,48	0,49	0,54	0,09	0,17	2024	2035 ^o	0,72	0,55	0,77	0,68	0,11	0,17
34	Dill apiole	1613	1620 ^b	0,35	1,24	0,33	0,64	0,52	0,81	2364	2350 ^p	1,00
35	1,10-di-epi-Cubenol	1619	1618 ^b	0,32	0,44	0,41	0,39	0,06	0,15

Nº	COMPUESTOS	DB5 - MS							HPINOWAX - MS								
		Ik ^{cal}	Ik ^{ref}	% de Cantidad Relativa ^a			\bar{X}	σ	C.V.	Ik ^{cal}	Ik ^{ref}	% de Cantidad Relativa ^a			\bar{X}	σ	C.V.
				PE1	PE2	PE3						PE1	PE2	PE3			
36	1 epi-Cubenol	1621	1527 ^b	1,06	0,73	1,13	0,97	0,21	0,22	2062	2059 ^o	0,41	0,44	0,53	0,46	0,06	0,13
37	τ -Cadinol	1634	1638 ^b	0,96	1,28	1,23	1,16	0,17	0,15	2174	2180 ⁱ	1,08	1,45	1,43	1,32	0,21	0,16
38	τ -Muurolol	1637	1640 ^b	0,69	0,95	0,96	0,87	0,15	0,18
39	α -murolol (torreyol)	1639	1644 ^b	0,84	0,96	1,03	0,94	0,10	0,10	2203	2209 ^p	0,42	0,59	0,64	0,55	0,11	0,21
40	Daucol	1644	1641 ^b	2,31	2,58	2,96	2,62	0,32	0,12	2306	2292 ^q	2,29	2,84	3,00	2,71	0,37	0,14
41	α -Cadinol	1648	1652 ^b	1,58	2,29	2,41	2,09	0,45	0,21	2235	2240 ^r	1,32	2,03	1,96	1,77	0,39	0,22
42	α -Bisabolol Oxide B	1659	1656 ^b	0,41	0,49	0,37	0,42	0,06	0,15
43	3-Thujopsanone	1665	1653 ^b	12,31	11,70	10,76	11,59	0,78	0,07	2342	10,97	10,69	9,75	10,47	0,64	0,06
44	Shyobunol	1684	1688 ^b	5,29	6,20	5,87	5,79	0,46	0,08	1941	1949 ^s	3,43	2,10	3,49	3,01	0,79	0,26
45	Guaiol acetate	1739	1725 ^b	1,97	1,21	2,12	1,76	0,49	0,28	2191	2156 ^t	2,86	2,44	3,44	2,91	0,50	0,17
46	Limonene	1194	1196 ^h	1,22	0,92	0,88	1,01	0,19	0,18
47	Bicycloelemene	1476	1478 ^m	0,17	0,27	0,24	0,23	0,05	0,22
48	Ledene	1687	1696 ^u	0,32	0,35	0,34	0,34	0,01	0,04
49	Epi-bicyclo sesquiphellandrene	1703	1719 ^o	0,35	0,26	0,35	0,32	0,05	0,17
50	α -selinene	1714	1727 ^c	0,28	0,25	0,26	0,02	0,09
51	Geranyl acetate	1763	1765 ^a	0,35	0,21	0,28	0,10	0,37
52	Germacrene B	1765	1776 ^f	0,24	0,31	0,24	0,26	0,04	0,14
53	epi-Cubebol	1888	1900 ^v	1,16	0,82	1,29	1,09	0,24	0,22
54	Spathulenol	2126	2129 ^e	1,25	1,02	1,49	1,25	0,24	0,19
55	β -Eudesmol	2230	2220 ^b	0,43	0,39	0,53	0,45	0,07	0,16
56	Isospathulenol	2261	2251 ^w	1,14	0,90	1,31	1,11	0,21	0,19
		*TOTAL IDENTIFICADO					98,98	*TOTAL IDENTIFICADO					94,98				

a= % promedio calculados en base al % del área de los picos reportados en la columna DB5MS y HP-INOWAX respectivamente

*= Sumatoria del porcentaje relativo de los compuestos identificados en ambas columnas

PE1: Aceites de la primera recolección PE2: Aceites de la segunda recolección PE3: Aceites de la tercera recolección

\bar{X} = Promedio

σ = desviación estándar

CV = Coeficiente de variación

Ik^{cal} = Índice de kóvats calculado

Ik^{ref} = Índice de kóvats reportado en la literatura: ^cref. 1; ^dref. 2; ^eref. 4; ^fref. 5; ^gref. 6; ^href. 7; ⁱref. 8; ^jref. 9; ^kref.12; ^lref. 16; ^mref. 22; ⁿref. 28; ^oref. 33; ^pref. 34; ^qref. 36; ^rref. 39; ^sref. 40; ^tref. 41; ^uref. 44; ^vref. 45; ^wref. 48; ^xref. 53; ^yref. 56. ver anexo(V)

Los compuestos mayoritarios del aceite esencial en la columna DB5-MS, se pueden observar en la figura 23, entre los cuales tenemos: α -Phellanderene (6,89%), δ -Elemene (6,83%), β -Elemene (3,56%), α -Humulene (3,20%), Bicyclogermacrene (12,98), δ -Cadinene (3,85%), E-Nerolidol (6,88%), Germacrene-D-4-ol (5,04%), Thujopsanone <3-> (11,59%), y Shyobunol (5,79%).

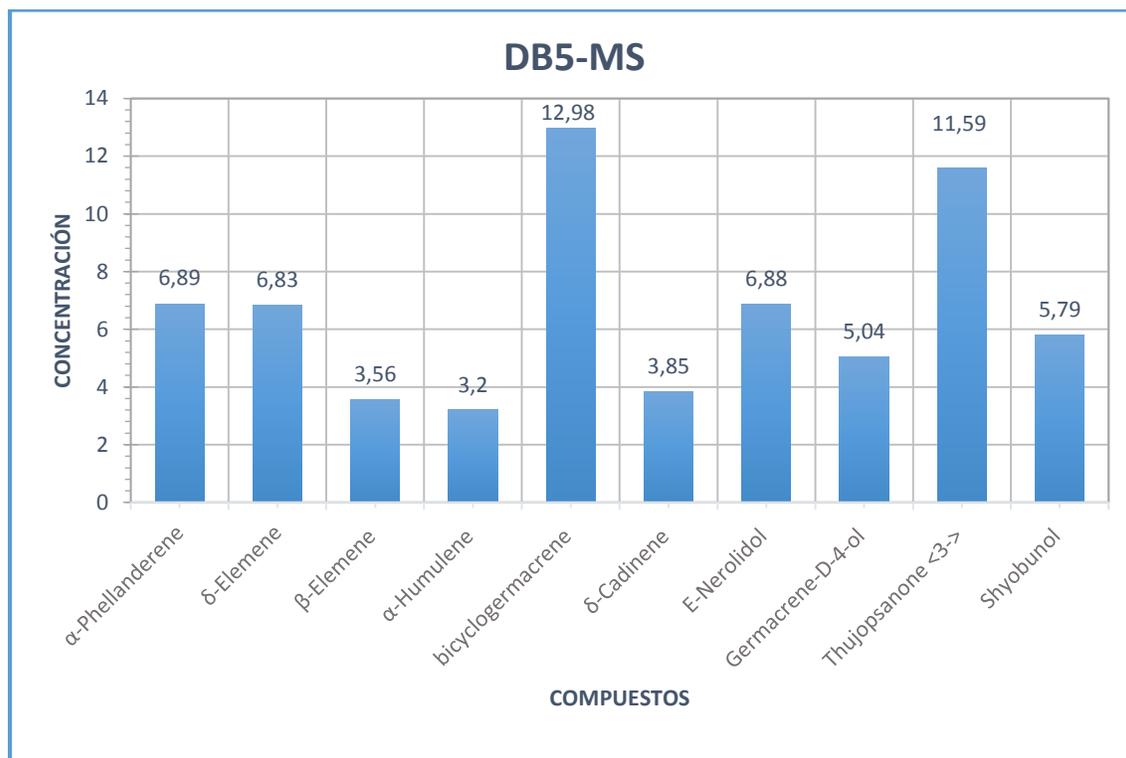


Figura 23. Compuestos mayoritarios en columna no polar DB-5MS.
Fuente: La autora.

Los porcentajes de los compuestos mayoritarios del aceite esencial en la columna HP-INOWAX, se muestran en la figura 24, entre los cuales tenemos: α -Phellanderene (7,35%), δ -Elemene (6,43%), β -Elemene (4,82%), α -Humulene (3,49%), Bicyclogermacrene (11,83), δ -Cadinene (7,7%), Shyobunol (3,01%), E-Nerolidol (12,18%), 3-Thujopsanone (10,47%).

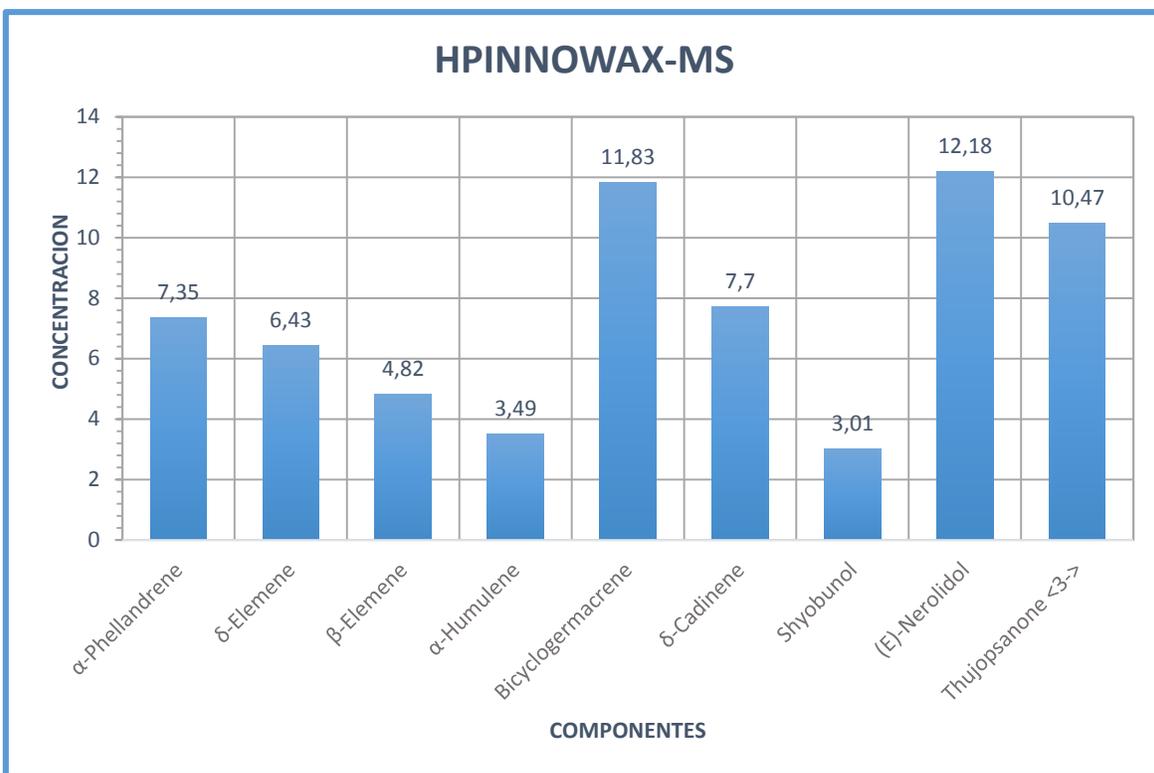


Figura 24. Compuestos mayoritarios en columna polar HP-INNOWAX.
Fuente: La autora

El análisis cuantitativo se realizó mediante la comparación del porcentaje de cantidad relativa de los picos detectados en FID con el porcentaje de cantidad relativa de los picos de los compuestos identificados en masas, el resultado se observa en la Tabla 11, en la cual se presentan los porcentajes de cantidad relativa por recolección, el promedio y la desviación estándar.

Mediante el análisis cualitativo y cuantitativo se confirma la presencia de los compuestos identificados en el aceite esencial.

Tabla 11. Comparación de la cantidad relativa (%) de los compuestos determinados por CG-MS y CG-FID.

Nº	COMPUESTOS	DB5MS										HP-INNOWAX											
		% de Cantidad Relativa						\bar{X}		σ		% de Cantidad Relativa						\bar{X}		σ			
		PE1		PE2		PE3		MS	FID	MS	FID	MS	FID	PE1		PE2		PE3		MS	FID	MS	FID
		MS	FID	MS	FID	MS	FID							MS	FID	MS	FID	MS	FID				
1	α -Pinene	2,20	2,74	1,01	1,31	0,85	1,15	1,35	1,73	0,74	0,87	2,56	2,91	1,09	1,37	0,98	1,18	1,54	1,82	0,88	0,95		
2	β -Pinene	0,72	1,06	0,57	0,85	0,65	1,00	0,65	0,97	0,08	0,11	0,86	1,11	0,65	0,90	0,76	1,02	0,76	1,01	0,11	0,11		
3	α -Phellandrene	8,03	8,46	6,64	6,92	6,01	6,40	6,89	7,26	1,03	1,07	8,80	9,45	6,92	7,95	6,33	7,01	7,35	8,14	1,29	1,23		
4	p-Cymene	0,37	0,37	0,33	0,32	0,35	0,34	0,20	0,20	0,61	0,08	0,31	0,05	0,58	0,06	0,50	0,07	0,17	0,01		
5	β -Phellandrene	2,11	1,27	1,63	1,04	1,52	0,95	1,75	1,09	0,31	0,17	1,12	1,35	0,86	1,05	0,79	0,96	0,93	1,12	0,17	0,20		
6	(Z)- β -Ocimene	0,18	0,20	0,22	0,37	0,19	0,33	0,21	0,35	0,12	0,20		
7	(E)- β -ocimene	0,33	0,36	0,25	0,13	0,29	0,25	0,17	0,18	0,45	0,68	0,23	0,39	0,33	0,52	0,34	0,53	0,11	0,14		
8	Linalool	0,34	0,33	0,57	0,21	0,46	0,24	0,51	0,23	0,30	0,13		
9	Bornyl acetate	0,22	0,31	0,28	0,32	0,20	0,19	0,24	0,26	0,14	0,16		
10	δ -Elemene	6,34	6,47	7,81	7,95	6,35	6,68	6,83	7,03	0,85	0,80	5,97	5,61	7,55	7,35	5,77	5,59	6,43	6,19	0,97	1,01		
11	β -Elemene	3,32	4,35	4,41	5,42	2,95	3,91	3,56	4,56	0,76	0,78	4,44	3,95	6,01	5,22	4,02	3,57	4,82	4,25	1,05	0,87		
12	α -Gurjunene	0,30	0,40	0,20	0,32	0,25	0,36	0,15	0,21	0,31	0,40	0,20	0,31	0,25	0,36	0,15	0,21		
13	(E)- β -Caryophyllene	0,87	0,79	1,28	1,52	0,85	1,10	1,00	1,14	0,24	0,36		
14	α -Humulene	2,98	3,05	3,79	3,91	2,83	2,98	3,20	3,31	0,51	0,52	3,20	3,34	4,12	4,21	3,16	3,27	3,49	3,61	0,54	0,52		
15	γ -Muuroolene	0,48	0,61	0,60	0,73	0,56	0,74	0,55	0,70	0,06	0,07	0,98	0,32		
16	Germacrene-D	1,36	1,47	2,08	2,17	1,67	1,86	1,70	1,83	0,36	0,35	1,47	1,70	2,27	2,43	1,79	2,04	1,84	2,06	0,40	0,37		
17	β -Selinene	0,26	0,30	0,41	0,45	0,23	0,32	0,30	0,36	0,10	0,08	0,32	0,30	0,40	0,39	0,30	0,33	0,34	0,34	0,05	0,04		
18	trans-Muurolo-4(14),5-diene	0,50	0,59	0,43	0,64	0,47	0,71	0,46	0,65	0,03	0,06		
19	Bicyclogermacrene	10,71	10,81	13,45	13,34	14,77	14,79	12,98	12,98	2,07	2,01	9,75	9,48	12,50	12,40	13,24	13,01	11,83	11,63	1,84	1,89		
20	α -Muuroolene	2,16	2,06	2,04	1,91	1,97	1,90	2,06	1,95	0,10	0,09	0,60	0,64	0,66	0,68	0,72	0,75	0,66	0,69	0,06	0,06		
21	Germacrene-A	1,73	1,30	2,10	1,63	1,44	1,06	1,76	1,33	0,33	0,28		
22	α -Amorphene	1,18	1,13	1,21	1,20	1,23	1,17	1,21	1,17	0,02	0,03	0,29	0,48	0,34	0,48	0,35	0,50	0,33	0,48	0,03	0,01		
23	γ -Cadinene	3,35	2,47	1,98	1,55	3,36	2,59	2,90	2,20	0,79	0,57		
24	δ -Cadinene	3,71	3,43	3,76	3,60	4,09	3,67	3,85	3,57	0,21	0,12	7,18	6,62	8,14	6,89	7,78	6,63	7,70	6,71	0,49	0,15		
25	α -Chamigrene	0,58	0,41	0,60	0,56	0,52	0,41	0,57	0,46	0,04	0,09		
26	α -Alaskene	0,37	0,31	0,31	0,40	0,33	0,32	0,34	0,34	0,03	0,05		
27	α -Cadinene	0,21	0,29	0,24	0,23	0,23	0,26	0,13	0,15	0,41	0,22	0,70	0,55	0,35		
28	Elemol	0,95	1,16	0,77	0,97	1,56	1,81	1,09	1,31	0,41	0,44	1,18	1,95	1,02	1,81	1,87	2,67	1,35	2,14	0,45	0,46		
29	E-Nerolidol	8,56	8,98	5,53	5,71	6,54	6,99	6,88	7,23	1,54	1,65	14,02	13,39	10,43	9,94	12,09	11,64	12,18	11,65	1,79	1,72		
30	Germacrene-D-4-ol	5,25	4,80	4,33	4,00	5,54	5,22	5,04	4,67	0,64	0,62		
31	Globulol	0,29	0,32	0,25	0,33	0,31	0,37	0,28	0,34	0,03	0,02	0,20	0,13	0,24	0,24	0,22	0,51	0,22	0,29	0,02	0,20		
32	Viridiflorol	0,93	0,45	0,75	0,75	0,95	0,59	0,88	0,60	0,11	0,15	0,64	0,31	0,70	0,34	0,65	0,34	0,67	0,33	0,03	0,01		
33	Ledol	0,65	0,72	0,48	0,59	0,49	0,58	0,54	0,63	0,09	0,08	0,72	0,80	0,55	0,64	0,77	0,86	0,68	0,77	0,11	0,11		
34	Dill apiole	0,35	0,30	1,24	0,62	0,33	0,33	0,64	0,41	0,52	0,18	1,00	0,80		
35	1,10-di-epi-Cubenol	0,32	0,36	0,44	0,46	0,41	0,35	0,39	0,39	0,06	0,06		

Nº	COMPUESTOS	DB5MS										HP-INNOWAX									
		% de Cantidad Relativa						\bar{X}		σ		% de Cantidad Relativa						\bar{X}		σ	
		PE1		PE2		PE3						PE1		PE2		PE3					
		MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID
36	1 epi-Cubenol	1,06	0,90	0,73	0,98	1,13	0,98	0,97	0,95	0,21	0,05	0,41	0,20	0,44	0,20	0,53	0,22	0,46	0,21	0,06	0,01
37	τ -Cadinol	0,96	0,51	1,28	1,01	1,23	1,00	1,16	0,84	0,17	0,28	1,08	0,89	1,45	1,17	1,43	1,29	1,32	1,12	0,21	0,20
38	τ -Muurolol	0,69	0,75	0,95	0,90	0,96	0,93	0,87	0,86	0,15	0,10
39	α -murolol (torreyol)	0,84	0,61	0,96	0,60	1,03	0,69	0,94	0,63	0,10	0,05	0,42	0,38	0,59	0,51	0,64	0,57	0,55	0,49	0,11	0,10
40	Daucol	2,31	1,57	2,58	2,10	2,96	2,29	2,62	1,99	0,32	0,38	2,29	2,13	2,84	2,61	3,00	2,82	2,71	2,52	0,37	0,35
41	α -Cadinol	1,58	2,07	2,29	2,41	2,41	2,68	2,09	2,39	0,45	0,31	1,32	1,21	2,03	1,76	1,96	1,73	1,77	1,57	0,39	0,31
42	α -Bisabolol Oxide B	0,41	0,30	0,49	0,39	0,37	0,30	0,42	0,33	0,06	0,05
43	3-Thujopsanone	12,31	11,72	11,70	11,23	10,76	10,23	11,59	11,06	0,78	0,76	10,97	10,17	10,69	9,98	9,75	9,08	10,47	9,74	0,64	0,58
44	Shyobunol	5,29	4,74	6,20	5,58	5,87	5,29	5,79	5,20	0,46	0,43	3,43	3,04	2,10	1,92	3,49	3,10	3,01	2,69	0,79	0,67
45	Guaiol acetate	1,97	1,96	1,21	1,27	2,12	2,07	1,76	1,77	0,49	0,44	2,86	1,83	2,44	1,31	3,44	2,02	2,91	1,72	0,50	0,36
46	Limonene	1,22	1,56	0,92	1,23	0,88	1,16	1,01	1,32	0,19	0,22
47	Bicycloelemene	0,17	0,33	0,27	0,43	0,24	0,43	0,23	0,39	0,05	0,05
48	Ledene	0,32	0,39	0,35	0,42	0,34	0,41	0,34	0,41	0,01	0,02
49	Epi-bicyclo sesquiphellandrene	0,35	0,52	0,26	0,40	0,35	0,48	0,32	0,47	0,05	0,06
50	α -selinene	0,28	0,35	0,25	0,30	0,26	0,32	0,15	0,19
51	Geranyl acetate	0,35	0,37	0,21	0,34	0,28	0,36	0,18	0,21
52	Germacrene B	0,24	0,22	0,31	0,24	0,24	0,20	0,26	0,22	0,04	0,02
53	epi-Cubebol	1,16	1,18	0,82	0,88	1,29	1,30	1,09	1,12	0,24	0,21
54	Spathulenol	1,25	1,23	1,02	1,02	1,49	1,43	1,25	1,23	0,24	0,21
55	β -Eudesmol	0,43	0,49	0,39	0,44	0,53	0,56	0,45	0,50	0,07	0,06
56	Isospathulenol	1,14	1,17	0,90	0,92	1,31	1,31	1,11	1,13	0,21	0,20
*Total identificado								98,98	97,44	*Total identificado								94,98	93,06		

Compuestos según el orden de elución en la columna DB-5MS.

PE=*Piper ecuadorensis*

PE1=Aceites de la primera recolección. PE2: Aceites de la segunda recolección. PE3: Aceites de la tercera recolección.

*=Sumatoria del % de cantidad relativa en la columna DB-5MS-MASAS y DB-5MS-FID.

**=Sumatoria del % de cantidad relativa en la columna HP-INNOWAX-MASAS y HP-INNOWAX-FID

\bar{X} =Promedio

σ = desviación estándar

NO IDENTIFICADO: 222(10,25); 207(7,69); 204(12,17); 189(7,69); 179(6,41); 161(35,89); 151(6,92); 137(22,43); 123(25,64); 121(39,74); 109(47,43); 107(29,48); 105(28,20); 95(30,76); 84(100); 83(48,71); 81(65,25); 79(23,07); 69(34,16); 67(32,05); 55(35,89); 53(15,38); 43(17,94); 41(36,96); 39(12,82)

Del aceite esencial de *Piper ecuadorensis* se lograron identificar 56 compuestos, de los cuales 35 compuestos están presentes en ambas columnas; en la columna DB-5MS se identificaron 45 compuestos con un porcentaje de identificación de 98,98% y en la columna HP-INNOWAX se identificaron 46 compuestos que representan el 94,98%.

Piper ecuadorensis es una especie que aún no reporta estudios referentes a la composición química, por lo que no es posible su comparación con alguna referencia. Sin embargo, se han efectuado estudios acerca de la composición química de varios aceites esenciales del género *Piper*, encontrándose como constituyentes principales fenilpropanoides, monoterpenoides y sesquiterpenoides (Sánchez et al., 2009).

En cuanto a los compuestos mayoritarios reportados en el presente estudio tenemos: - Phellanderene (6,89%), δ -Elemene (6,83%), β Elemene (3,55%), α -Humulene (3,20%), Bicyclogermacrene (12,98%), δ -Cadinene (3,85%), (E)-Nerolidol (6,88%), Germacrene D-4-ol (5,04%), 3-Thujopsanone (11,59%), y Shyobunol (5,79%).

Las diferencias presentadas en su composición, pueden deberse a varios factores; en ese sentido Bandoni et al., (2009) expresaron que es casi imposible lograr dos aceites esenciales idénticos. Como resultado del grado de sensibilidad analítica con que se trabaje, siempre se podrá encontrar alguna diferencia entre dos partidas de un mismo aceite esencial (Acevedo et al., 2013).

Es importante hacer hincapié que el conocer la composición química del aceite esencial de esta planta medicinal, deja abierta la puerta para iniciar estudios posteriores que contribuirán a la valoración de la biodiversidad ecuatoriana con miras a aplicaciones farmacéuticas o cosméticas.

3.4.1.1. Datos espectrales del compuesto no identificado.

Después de analizar la mayoría de los compuestos con la bibliografía de referencia, se presenta el espectro de masas de uno de los picos que no se logró identificar. Además se analizaron los valores de abundancia de los diferentes iones (eje y) en función de la relación masa/carga (m/z) (eje x). En la figura 25 se observa el espectro de masas del compuesto que no identificado.

Se expresa el espectrograma del compuesto no identificado para que se analice más profundamente en estudios que se realicen en el futuro.

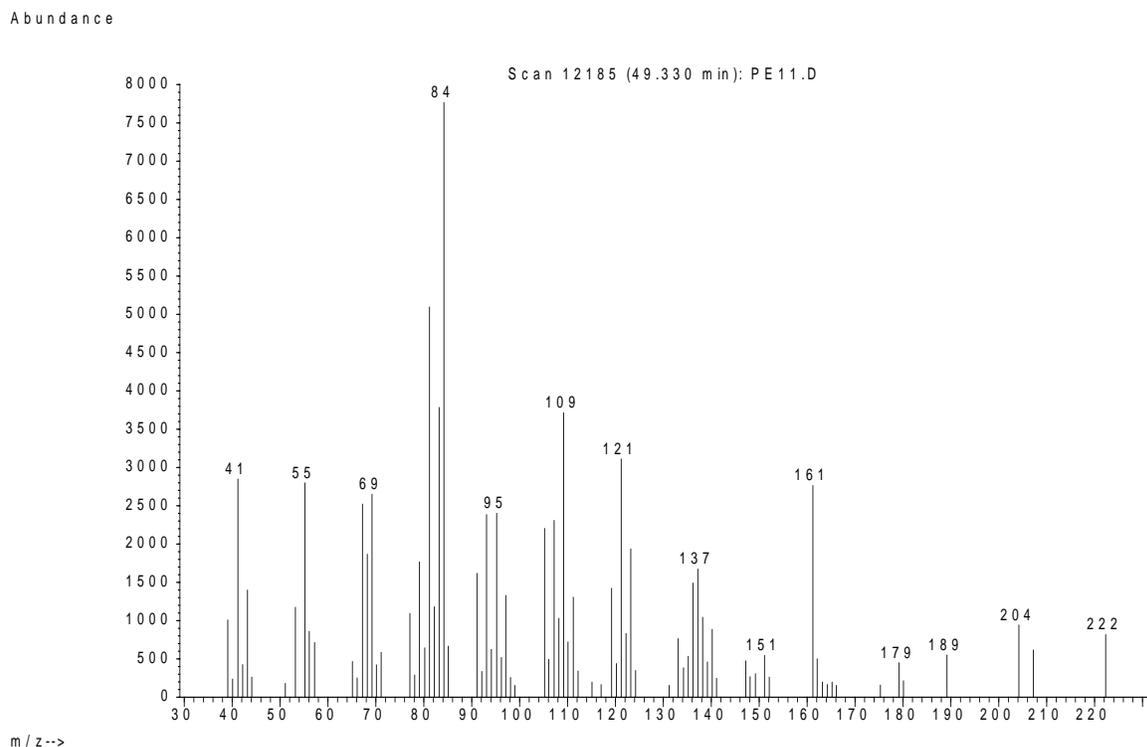


Figura 25. Compuesto no identificado – Columna polar HP-INNOWAX.
Fuente: La autora.

A continuación se muestran los datos de abundancia y de masa/carga. El primer valor corresponde a masa/carga (m/z) y el valor en paréntesis corresponde a la abundancia del ion, este valor esta dado en porcentaje relativo.

222(10,25); 207(7,69); 204(12,17); 189(7,69); 179(6,41); 161(35,89); 151(6,92); 137(22,43); 123(25,64); 121(39,74); 109(47,43); 107(29,48); 105(28,20); 95(30,76); 84(100); 83(48,71); 81(65,25); 79(23,07); 69(34,16); 67(32,05); 55(35,89); 53(15,38); 43(17,94); 41(36,96); 39(12,82)

3.5. Actividad biológica del aceite esencial de *Piper ecuadorensis*

Los métodos empleados para evaluar la actividad antimicrobiana permitieron medir la susceptibilidad in vitro de los microorganismos frente a agentes antimicrobianos

determinando la potencia de la sustancia, y la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas de una droga de origen vegetal.

3.5.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana.

CMI es la mínima concentración de un compuesto capaz de inhibir el crecimiento bacteriano tras 18-24 horas de incubación. Los resultados de la CMI de los aceites obtenidos de las destilaciones de *P. ecuadorensis* se exponen en la Tabla 12.

Tabla 12. CMI antibacteriana ($\mu\text{g/mL}$) del aceite esencial frente a 7 cepas bacterianas

Aceite	GRAM-NEGATIVAS					GRAM-POSITIVAS	
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 9997	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Salmonella typhimurium</i> (LT2)	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
PE11	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	500 $\mu\text{g/mL}$
PE12	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	500 $\mu\text{g/mL}$
PE13	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	250 $\mu\text{g/mL}$
PE21	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	500 $\mu\text{g/mL}$
PE22	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	125 $\mu\text{g/mL}$
PE23	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	250 $\mu\text{g/mL}$
PE31	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	250 $\mu\text{g/mL}$
PE32	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	250 $\mu\text{g/mL}$
PE33	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	125 $\mu\text{g/mL}$
Control	Gentamicina 0,39 $\mu\text{g/ml}$				Gentamicina 1,95 $\mu\text{g ml}$		Gentamicina 0,39 $\mu\text{g/ml}$

PE=*Piper ecuadorensis*
PE1=Aceites de la primera recolección. **PE2**: Aceites de la segunda recolección. **PE3**: Aceites de la tercera recolección.

Fuente: La autora.

El género *Piper* ha sido objeto de estudios fitoquímicos y biológicos, motivados por sus numerosas aplicaciones etnobotánicas y por ser particularmente útiles como antivirales, antimicóticos y antibacterianos (Sánchez et al., 2009).

Como se puede observar el aceite esencial de *Piper ecuadorensis* no inhibió el crecimiento bacteriano de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* y *Enterococcus faecalis* hasta las concentraciones ensayadas. Mientras que para la bacteria *Staphylococcus aureus*, los aceites de la primera recolección presentaron una CMI de 1000 y 250 $\mu\text{g/mL}$; los aceites de la segunda

recolección una CMI 500, 150 y 250 µg/mL respectivamente, y para los aceites de la tercera recolección presentan una CMI de 250 y 150 µg/mL.

Según los parámetros descritos por Holetz et al. (2002), la actividad antimicrobiana se puede clasificar de la siguiente manera:

- **Buena:** CMI <100 µg/mL
- **Moderada:** CMI de 100 a 500 µg/mL
- **Débil:** CMI de 500 a 1000 µg/mL
- **Inactiva :** más de 1.000 µg/mL

Según la clasificación de Holetz et al. (2002) y de acuerdo a los valores de CMI expuestos, podemos decir que los aceites evaluados presentan una actividad antimicrobiana moderada frente a *Staphylococcus aureus*. Estos resultados evidencian que la bacteria *Staphylococcus aureus* resulta más sensible a la acción del aceite, lo que indica las potencialidades antimicrobianas del aceite evaluado y su posible uso en el tratamiento de enfermedades bacterianas.

En la literatura no se encontró estudios sobre la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Piper* ecuatoriano frente a la bacteria, por lo cual los resultados obtenidos aumentan el conocimiento sobre la actividad biológica de dicho aceite y las posibilidades de aplicación práctica.

Sin embargo existen estudios de diferentes especies del género *Piper* que han mostrado actividad antibacteriana contra *S. aureus*; por ejemplo, en este caso del extracto etanólico y acuoso de *Piper aduncum* mostraron una CMI de 16 y 32 µg/mL respectivamente; así mismo, el extracto de acetato de etilo de *Piper porphyrophyllum* presentó un CMI de 62,5 µg/mL (Giraldo, 2012). A pesar de conocer actividad contra *S. aureus* en otras especies del género *Piper*, no es posible comparar nuestros resultados con los obtenidos por extractos, puesto que el criterio de evaluación es diferente; sin embargo, es importante destacar que especies del mismo género tanto como el aceite de *Piper ecuatoriano* mostraron inhibición contra esta bacteria .

La literatura científica relata que la actividad antimicrobiana presentada por los aceites esenciales se debe principalmente a la presencia de terpenoides, seguido por terpenoides

con grupos alcoholes, luego los que poseen grupos aldehídos y por último los que contienen grupos cetónicos (Ochoa et al., 2012; Sánchez et al., 2009).

Entre los compuestos a los que se le atribuyen propiedades antibacterianas, podemos citar: terpenos como el safrol pero no es el único, existen otros como el linalol, timol, carvacrol, eugenol, α -pinene y β -pinene, α -humuleno, β -cariofileno, β -elemeno, germacreno, p-cimeno, γ -terpineno, mirceno, entre otros; algunos de los cuales se encuentran en proporción considerable en el aceite evaluado (Sánchez et al., 2013; Sánchez et al., 2009).

Teniendo en cuenta que un aceite esencial está conformado por un número amplio de compuestos químicos, es muy probable que su actividad antimicrobiana no sea atribuible a un mecanismo específico, sino a la acción combinada de varios de ellos sobre distintas localizaciones de la célula. Se plantea incluso, que algunos compuestos que no presentan actividad antimicrobiana de manera independiente, incrementan la acción cuando se mezclan con otros. (Pino, O. et al., 2012; Sánchez et al., 2009).

3.5.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antifúngica.

En la tabla 13 se expone los valores de la concentración mínima inhibitoria de los aceites frente a los dermatofitos *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*.

Tabla 13. CMI del aceite esencial frente a dos cepas fúngicas.

HONGOS		
ACEITES	Trichophyton rubrum ATCC 28188	Trichophyton mentagrophytes ATCC 28185
PE11	62,5 µg/mL	125 µg/mL
PE12	62,5 µg/mL	62,5 µg/mL
PE13	62,5 µg/mL	125 µg/mL
PE21	31,25 µg/mL	62,5 µg/mL
PE22	31,25 µg/mL	62,5 µg/mL
PE23	31,25 µg/mL	62,5 µg/mL
PE31	62,5 µg/mL	62,5 µg/mL
PE32	62,5 µg/mL	62,5 µg/mL
PE33	62,5 µg/mL	62,5 µg/mL
Control	Itraconazol 0,39 µg/mL	
<p>PE=<i>Piper ecuadorensis</i> PE1=Aceites de la primera recolección. PE2: Aceites de la segunda recolección. PE3: Aceites de la tercera recolección.</p>		

Fuente: La autora.

Todos los aceites esenciales obtenidos del material de las diferentes recolecciones inhibieron el crecimiento de los dermatofitos en diferentes concentraciones, expresándose como la concentración mínima inhibitoria frente al control de Itraconazol.

De acuerdo a la clasificación mencionada por Holetz et al. (2002), los aceites esenciales frente a *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* presentan una actividad buena a excepción de los aceites de la primera recolección (125 µg/mL) que muestran una actividad moderada frente a *T. mentagrophytes*.

Estudios realizados por , Ramirez, J. et al. (2013) con el extracto de la planta *P. ecuadorensis* revelan que efectivamente esta especie presenta actividad antifúngica representativa frente a *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*.

Otros estudios revelan que la actividad antifúngica se puede atribuir a la presencia de algunos componentes tales como carvacrol, α -terpinyl acetate, cimeno, timol, pineno, linalol que ya se sabe que presentan actividad antimicrobiana (Nuzhat & Vidyasagar, 2013).

3.6. Actividad antioxidante

3.6.1. Método ABTS⁺.

3.6.1.1. Lectura de los estándares Trolox/BHT.

Al evaluar la capacidad antioxidante de las muestras del aceite esencial de *Piper ecuadorensis* a diferentes concentraciones frente al radical ABTS⁺, se obtuvieron los datos de absorbancia que fueron reemplazados en la ecuación (3) que se describe en la metodología, encontrando así los valores de los porcentajes de disminución para cada concentración, que se observan en la Tabla 14.

Tabla 14. Datos del método ABTS⁺ para los estándares TROLOX y BHT

DATOS ABTS⁺				
	BHT		TROLOX	
Concentración (µM)	Absorbancia determinada	Porcentaje de Disminución (%)	Absorbancia determinada	Porcentaje de Disminución (%)
1000	0,0000	100	0,1863	83,18
800	0,0000	100	0,2860	74,19
600	0,0180	98,38	0,4203	62,06
450	0,1720	84,48	0,5037	54,54
300	0,3510	68,32	0,6497	41,37
150	0,4817	56,53	0,7087	36,04
25	0,5703	48,53	0,7413	33,09
0	0,6750	39,08	0,8190	26,08

Absorbancia de la solución de trabajo: 1,108

Fuente: La autora.

3.6.1.2. Lectura de las muestras de aceite esencial.

En la tabla 15, se encuentran los resultados obtenidos de la actividad antioxidante del aceite esencial, en ella se describe las concentraciones evaluadas, la absorbancia y el cálculo del porcentaje de inhibición obtenido para cada dilución.

Tabla 15. Datos del método ABTS⁺ para el aceite esencial.

ACEITE		
Concentración (µM)	Absorbancia determinada	% de Disminución
1000	0,6443	41,81
500	0,7220	34,84
100	0,7320	33,94
50	0,7547	31,89
25	0,7693	30,57
12,5	0,7707	30,45
5	0,7810	29,51
0	0,8087	27,02

Fuente: La autora

El método ABTS⁺ sirve para determinar la capacidad de un antioxidante captando radicales libres, y esto se puede determinar por el porcentaje de disminución o decoloración del catión radical ABTS^{•+} (Pérez et al., 2013).

Según los resultados observados tanto en la tabla 15 podemos comprobar que el aceite esencial evaluado no posee actividad antioxidante a las concentraciones evaluadas frente al radical ABTS, ya que el porcentaje de disminución a una concentración de 1000 ppm fue de 41,81% valores bajos con respecto a Trolox y BHT, ya que los valores esperados deberían ser superiores a 50% de inhibición del radical ABTS.

3.6.2. Método Radical DPPH.

3.6.2.1. Lectura de los estándares Trolox/BHT.

Al evaluar la capacidad antioxidante de las muestras de aceite esencial a diferentes concentraciones frente al radical DPPH se obtuvieron los datos de absorbancia que fueron reemplazados en la ecuación (3) que se describe en la metodología, encontrando así los valores de porcentajes de disminución, que se observan en la Tabla 16.

Tabla 16. Datos del método DPPH para los estándares TROLOX y BHT.

DATOS DPPH				
Concentración (µM)	BHT		TROLOX	
	Absorbancia determinada	% de Disminución	Absorbancia determinada	% de Disminución
1000	0,1810	83,68	0,5280	52,48
800	0,2470	77,77	0,5847	47,37
600	0,3867	65,2	0,7237	34,86
450	0,4783	56,95	0,8313	25,17
300	0,5730	48,42	0,9267	16,59
150	0,8400	24,39	0,9610	13,50
25	0,9840	11,43	0,9800	11,79
0	1,0187	8,31	0,9947	10,47

Absorbancia de la solución de trabajo: 1,111

Fuente: La autora

3.6.2.2. Lectura de las muestras de aceite esencial.

En la tabla 17, se encuentran los resultados obtenidos de la actividad antioxidante del aceite esencial, en ella se describe las concentraciones evaluadas, la absorbancia y el cálculo del porcentaje de inhibición obtenido para cada dilución.

Tabla 17. Datos del método DPPH para el aceite esencial.

ACEITE		
Concentración (µM)	Absorbancia determinada	% de Disminución
1000	0,9303	16,26
500	0,9517	14,34
100	0,9643	13,20
50	0,9720	12,51
25	1,0170	9,03
12,5	1,0277	7,50
5	1,0343	6,90
0	1,0417	6,24

Fuente: La autora

Al evaluar las muestras de aceite esencial de *P. ecuadorensis*, se observó que a las concentraciones realizadas, el porcentaje de disminución con el método del radical DPPH, en ningún caso se alcanzaron valores superiores al 50%, razón por la cual podemos deducir que en las muestras evaluadas no se encuentran presentes compuestos que atrapen radicales libres, lo cual puede explicar la baja actividad mostrada frente a este radical.

Debe señalarse que, a pesar de las diferencias metodológicas, los resultados obtenidos con los métodos ABTS+ y DPPH• revelaron que el aceite esencial de *Piper ecuadorensis* no presentó actividad antioxidante ya que el porcentaje de disminución es bajo comparado con los estándares de referencia Trolox y BHT.

Los resultados obtenidos de actividad antiradical pueden expresarse como IC50 (Concentración Eficaz 50), la cual está definida como la concentración del antioxidante que disminuye la concentración del radical a un 50% de la cantidad inicial. En el presente caso no fue posible calcular el IC50 ya que el porcentaje de disminución fue menor y no superó el 50%.

Según Stashenko (2009), las propiedades tanto antioxidantes y antimicrobianas de los aceites esenciales se atribuyen a la presencia de compuestos fenólicos y sus derivados.

En un estudio realizado, el aceite esencial de *Piper auritum* presentó una muy escasa actividad atrapadora del radical DPPH· (0.0029 mg/L), en comparación con la presentada por la vitamina E (3.69 mg/L), sustancia antioxidante usada como referencia. En la cual dado que el análisis cromatográfico reveló la no existencia de compuestos de tipo fenólico, principales responsables de la actividad antioxidante de los aceites esenciales (García et al., 2007).

Según los datos presentados en el presente estudio demostraron que el aceite evaluado no posee propiedades antioxidantes, lo cual soporta el uso tradicional de *P. ecuadorensis* debido a que dicha especie es utilizada como cicatrizante de heridas según Ramirez, J. et al. (2013), para lo cual se llevan a cabo una serie de complejas reacciones bioquímicas, entre ellas la fase inflamatoria y podemos manifestar que los antioxidantes ayudan a reducir la inflamación es decir son utilizados como antiinflamatorios por lo tanto no puede ser considerada como antioxidante.

CONCLUSIONES

- ☞ En la composición química del aceite esencial se detectaron 56 compuestos, de los cuales se identificaron 45 compuestos en la columna no polar (DB-5MS) que representa el 98,98% y 46 compuestos en la columna polar (HP-INNOWAX). Que representa el 94,98%.
- ☞ Se identificaron 8 compuestos mayoritarios principales: α -Phellandrene (7,12%), δ -Elemene (6,63%), β -Elemene (4,19%), Bicyclogermacrene (12,41), δ -Cadinene (5,78%), E-Nerolidol (9,53%), 3-Thujopsanone (11,03%), Shyobunol (4,4%).
- ☞ El compuesto predominante fue bicyclogermacrene con un porcentaje de 11,03% el cual fue identificado en las dos columnas DB5MS y HP-INNOWAX.
- ☞ El aceite esencial de *Piper ecuadorensis* fue inactivos frente a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* y *Enterococcus faecalis* a las concentraciones ensayadas.
- ☞ El aceite evaluado presento una actividad antibacteriana moderada frente a *Staphylococcus aureus* (125-500 $\mu\text{g/mL}$)
- ☞ El aceite esencial tuvo una buena actividad inhibitoria frente a *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton. mentagrophytes*
- ☞ El aceite esencial evaluado no presento actividad antioxidante frente al método ABTS⁺ ni DPPH.
- ☞ El valor de la densidad relativa fue de 0,9269 g/cm³, el valor medio del índice de refracción fue de 1,5043.

RECOMENDACIONES

- ☞ Verificar si en la zona de recolección existe abundante población silvestre con el fin de evitar la extinción en la zona de estudio.
- ☞ Se recomienda evaluar la actividad de los aceites frente otras cepas bacterianas y fúngicas de interés en salud pública.
- ☞ Realizar posteriores investigaciones sobre la posible aplicación del aceite esencial de *Piper ecuadorensis* en la formulación de una forma farmacéutica ya que presenta una buena actividad antifúngica frente *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*

BIBLIOGRAFIA

- Acevedo, D., Navarro, M., & Montero, P. (2013). Composición Química del Aceite Esencial de las Hojas de Toronjil (*Melissa officinalis* L.). *Información tecnológica*, 24, 49-54.
- Andrade, J., Armijos, C., Malagón, O., & Lucero, H. (2009). *Plantas medicinales silvestres empleadas por la etnia Saraguro en la parroquia San Lucas, provincia de Loja, Ecuador*. Universidad Tecnica Particular De Loja
- Arango, G. P., & Vásquez, M. C. (2008). Efecto tóxico de *Verbena officinalis* (familia verbenaceae) en *Sitophilus granarius* (coleoptera: curculionidae). *Revista Lasallista de Investigación*, 5, 74-82.
- Arderiu, X., Lacambra, M., & Compañó, J. (1997). *Bioquímica clínica y patología molecular I* (2da ed. Vol. 1). Barcelona: Reverté, S.A.
- Arnao, M., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Journal Food Chemistry & Biodiversity*, 73, 239-244.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 446–475. doi: 10.1016
- Balslev, H., Navarrete, H., De la Torre, L., & Macía, M. J. (2008). Introducción. In De la Torre, Navarrete, et al. (Eds.), *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador* (pp. 1-3). Herbario QCA & Herbario AAU. Quito & Aarhus.
- Beltrán, M., Cantillo, M., & Vivas, A. (2013). Actividad antibacteriana de los aceites obtenidos de *Ocimum basilicum* L. var. *cinammom*, *O. album*, *O. thrysiflorum*, para uso potencial en fitocosmética. *Investigaciones Andina*, 15(27), 798-810.
- Bermúdez, A., Oliveira, M., & Velázquez, D. (2005). La Investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*, 30, 453-459.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technology*, 28, 28, 25-30.
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., & Mietzner, T. (2011). *Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología médica* (25a edición ed.). McGraw Hill Interamericana: México.
- Bustos, J., Hamdan, A., & Gutiérrez, M. (2006). *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Revista Biomedica*, 17(4), 287-305.
- Cañigual, S., & Vila, R. (2007). Los aceites esenciales en fitoterapia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6(5).

- Castro, A. (2008). *Composición química del aceite esencial de las hojas de Erythroxylum novogranatense (Morris) "coca", actividad antioxidante y determinación antibacteriana frente a Streptococcus mutans*. Doctor en Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Retrieved from <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/789>
- Celis, Á., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., & Cuca, L. E. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26, 97-106.
- De la Torre, L., Alarcón, D., Kvist, L. P., & Salazar L, J. (2008). Usos medicinales de las plantas. In De la Torre, Navarrete, et al. (Eds.), *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador* (pp. 105–114). Herbario QCA & Herbario AAU. Quito & Aarhus.
- Díaz, M., Rodríguez, C., & Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género Enterococcus como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 48, 147-161.
- Frassinetti, S., Caltavuturo, L., Cini, M., Della Croce, C. M., & Maserti, B. E. (2011). Antibacterial and Antioxidant Activity of Essential Oils from Citrus spp. *Journal of Essential Oil Research*, 23(1), 27-31. doi: 10.1080/10412905.2011.9700427
- Gallardo, F., Ruiz, J., Soto, S., Jiménez, M., & Vila, J. (2003). Distintos mecanismos de resistencia asociados a integrones en aislamientos clínicos de Salmonella typhimurium. *Revista Española de Quimioterapia*, 16(4), 398-402.
- García, A., Leyva, M., Martínez, J. R., & Stashenko, E. (2007). Determinación de la composición química y actividad antioxidante in vitro del aceite esencial de Piper auritum Kunth (Piperaceae) difundida en la costa Colombiana. *Scientia et Technica Año XIII*, 33, 439-442.
- Giraldo, A. (2012). *Estudio fitoquímico de Piper pesaresanum y Piper crassinervium (Piperaceae)*. Universidad Tecnológica de Pereira
- Gutiérrez, M., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *BOLETÍN INTEXTER (U.P.C.)*, 122, 39-46.
- Harris, D. (2007). *Análisis químico cuantitativo* (3 edición ed.). Editorial Reverté.
- Heras, M. F. (2012). *“Estudio etnobotánico en las explotaciones agropecuarias de la parroquia Tarqui”*. Tesis previa a la obtención del Título de Ingeniera Ambiental, Universidad Estatal Amazónica. Retrieved from <http://www.uea.edu.ec/jspui/handle/biblioteca/60>

- Hernández, A., Carbajal, P., Fernández, R., & Arenas, R. (2007). Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. Experiencia de 10 años (1996-2005) en un servicio de dermatología de un hospital general de la Ciudad de México. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24, 122-124.
- Herrera, M. L. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 34, 33-41.
- Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., Cortez, D. A. G., Nakamura, C. V., & Dias Filho, B. P. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 1027-1031.
- Hurtado, M. P., de la Parte, M. A., & Brito, A. (2002). *Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 22, 112-118.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology (Campinas)*, 25, 726-732.
- Margulis, L., & Sagan, D. (2012). El proceso de nutrición en las plantas. , 11(1). Retrieved from <http://www.mcgraw-hill.es/bcv/guide/capitulo/8448180895.pdf>
- Martínez, A. (2001). *Aceites esenciales*. Universidad de Antioquia. Facultad Química Farmacéutica Medellín.
- Mesa, A. M., Rincón, D. C., Toro, J. F., Tamayo, A., Blair, S., & Rojano, B. A. (2011). Actividad antioxidante de *Piper Piedecuestanum* Trel. & Yunck. y *Piper Subpedale* Trel. & Yunck. *Revista latinoamericana de química*, 39, 91-99.
- Molares, S., González, S. B., Ladio, A., & Agueda Castro, M. (2009). Etnobotánica, anatomía y caracterización físico-química del aceite esencial de *Baccharis obovata* Hook. et Arn. (Asteraceae: Astereae). *Acta Botanica Brasilica*, 23, 578-589.
- Morocho, P. D. V. (Cartographer). (2015). Mapa del área de recolección de la especie *Piper* ecuatorense
- Muedas, G., Toro, A., & Robles, J. (2008). Evaluación Electroquímica de la actividad antioxidante del extracto alcohólico de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 74, 233-246.
- Muñoz, A., Castañeda, M. L., Blanco, K. M., Cardenas, C. Y., Reyes, J. A., Kouznetsov, V. V., & Stashenko, E. E. (2007). Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de Timol y Carvacrol. *Scientia Et Technica*, 33, 125-128.

- Muriel, P. (2008). La diversidad de ecosistemas en el Ecuador. In De la Torre, Navarrete, et al. (Eds.), *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador* (pp. 28-38). Herbario QCA & Herbario AAU. Quito & Aarhus.
- Nuzhat, T., & Vidyasagar, G. M. (2013). Antifungal investigations on plant essential oils. A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 19-28.
- Ochoa, K., Paredes, L., Bejarano, D., & Silva, R. (2012). Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd (Wiskataya). *Scientia Agropecuaria*, 3, 291-302.
- Parra, J. E. (2011). *Contribución al estudio fitoquímico de la parte aérea de Piper cf. cumanense Kunth (Piperaceae)*. Magister en Ciencia-Química, Universidad Nacional De Colombia.
- Pérez, V., Lugo, E., Gutiérrez, M., & Del Toro Sánchez, C. (2013). Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta* Risso) y determinación de su actividad antioxidante. *Biotecnia*, 15(3), 18-22.
- Pino, N., Melendez, E., & Stashenko, E. (2009). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Piper lanceaeifolium*, planta usada tradicionalmente en Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8, 301-304.
- Pino, O., Sánchez, Y., Rojas, M. M., Abreu, Y., & Correa, T. M. (2012). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimpinella anisum* L. *Revista de Protección Vegetal*, 27, 181-187.
- Prats, G. (2006). *Microbiología Clínica*. Editorial Médica Panamericana: Buenos Aires - Argentina.
- Quesada, A. (2008). Las plantas medicinales. *Biocenosis*, 21((1-2)), 1-4.
- Ramirez, J., Cartuche, L., Morocho, V., Aguilar, S., & Malagon, O. (2013). Antifungal activity of raw extract and flavanons isolated from *Piper ecuadorensis* from Ecuador. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23, 370-373.
- Ramirez, L., & Marin, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia Et Technica.*, 15(42), 263-268.
- Rodríguez, M., Alcaraz, L., & Real, S. (2012). Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. *Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S. México*.
- Rueda, R. (2002). Micosis superficiales y dermatomicosis. *Colombia Médica*, 33(1), 10-16.

- Sánchez, Y., Correa, T. M., Abreu, Y., Martínez, B., Duarte, Y., & Pino, O. (2011). Caracterización química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. *Revista de Protección Vegetal*, 26, 170-176.
- Sánchez, Y., Correa, T. M., Abreu, Y., & Pino, O. (2013). Efecto del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth y sus componentes sobre *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson y *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson. *Revista de Protección Vegetal*, 28, 204-210.
- Sánchez, Y., Pino, O., Correa, T. M., Naranjo, E., & Iglesia, A. (2009). Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (caisimón de anís). *Revista de Protección Vegetal*, 24, 39-46.
- Segovia, I. K., Suárez, L. L., Castro, A. J., Suárez, S., & Ruiz, J. R. (2014). *Composición química del aceite esencial de Tagetes elliptica* Smith "chincho" y actividades antioxidante, antibacteriana y antifúngica (Vol. 13).
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Colombia: Convenio Andrés Bello (CAB).
- Skoog, D. A., West, D. M., & Holler, F. J. (1997). *Fundamentos de química analítica* (4ta ed. Vol. 2). Barcelona: Reverté, S.A.
- Stashenko, E. (2009). Aceites esenciales, *Centro de Investigaciones para la agroindustrialización de especies vegetales, aromáticas y medicinales tropicales*, pp. 1-180. Retrieved from <http://intranet.cibnor.mx/personal/bmurillo/docs/manual-aceites-esenciales.pdf>
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669-675. .
- ViajandoX. (2014). Bosque Protector Washapamba Retrieved 09 de enero, 2015, from <http://www.viajandox.com/loja/bosque-washapamba-saraguro.htm>
- Yáñez, X., & Cuadro, O. (2012). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* de tres zonas de Pamplona (Colombia). *Revista de la facultad de Ciencias Basicas*, 10(1), 52-61.
- Yépez, P. (2008). Las plantas en las creencias y mitos. In De la Torre, Navarrete, et al. (Eds.), *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador* (pp. 94-98). Herbario QCA & Herbario AAU. Quito & Aarhus.

ANEXOS

ANEXO 1

DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

PRINCIPIO:

La pérdida de peso de la muestra, debido a que es sometida a altas temperaturas en una estufa durante un tiempo determinado.

MATERIAL:

- Lámpara
- Pinza
- Balanza
- Crisol
- Desecador

PROCEDIMIENTO:

- Pesar en una cápsula o luna de reloj de 0,5 a 1 gr de la muestra; seguidamente colocarla durante 45 minutos en la lámpara ULTRA X a 37 °C.
- Enfriar la cápsula en el desecador por 5 minutos aproximadamente, hasta que la temperatura de la cápsula se iguale a la temperatura ambiente. Luego pesar y anotar el peso.
- Colocar la cápsula nuevamente en la estufa durante 15 minutos, enfriar en el desecador y pesar.
- Repetir el procedimiento hasta que el peso de la cápsula sea constante.

CÁLCULO:

$$Hm = \frac{(m_1 - m_2)}{(m_1 - m)} * 100$$

Dónde:

Hm: %de humedad

m: peso de la cápsula vacía (gr)

m1: peso de la cápsula + muestra a analizar (gr).

m 2: peso de la cápsula + muestra seca (gr).

ANEXO 2

DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA A 20°C

(Método de Referencia)

Según la AFNOR NF T 75-111 JUNIO 1982

PROPUESTA:

La presente norma está basada en la norma ISO 279-1981 publicada por la Organización Internacional de Normalización.

OBJETIVO DE APLICACIÓN:

La presente norma especifica el método referido a la determinación de la densidad relativa a 20°C de los aceites esenciales.

REFERENCIAS:

- NF T 75-003 Aceites esenciales-Reglas generales para la preparación.
- NF T 75-110 Aceites esenciales-Preparación de la muestra previa al análisis.

PRINCIPIO:

La densidad relativa a 20°C de un aceite esencial se define como la masa de un determinado volumen de aceite esencial a 20°C sobre la masa de un volumen igual de agua destilada a 20°C.

NOTA:

- Si es necesario operar a una temperatura diferente debido a la naturaleza del aceite para indicar la norma referente al aceite esencial. La corrección para 20°C es de 0.0007 a 0.0008 por grado centígrado.
- La masa volumétrica a 20°C de un aceite esencial se reporta como la masa de un cierto volumen del aceite esencial a 20°C.

APARATOS:

- Picnómetro de vidrio.
- Baño termostático, mantenido a una temperatura de 20°C ± 0.2°C.
- Termómetro de precisión graduado de 10 a 30°C, con una variación de 0.2°C a 0.1°C.
- Balanza analítica.

PROCEDIMIENTO:

- **Preparación del Picnómetro:** Limpiar rigurosamente y luego enjuagar el picnómetro, lavar con etanol y luego con acetona, pasarlo por una corriente de aire seco. Si es necesario secar el exterior del picnómetro con un trapo seco o con papel filtro. Cuando se equilibre la temperatura en el cuarto de balanza, pesar el picnómetro, con el tapón en su sitio con 1mg de precisión.
- **Peso del agua destilada:** Llenar el picnómetro con agua recién destilada, que esté a una temperatura de 20°C. Coloque el picnómetro en el baño termostático. Durante 30 minutos ajustar el nivel del agua hasta la marca, poner el tapón del picnómetro en su sitio, secar el exterior del picnómetro con un trapo seco o papel filtro. Cuando se equilibre la temperatura con el cuarto de balanzas, pesar el picnómetro lleno con el tapón en su sitio con un mg de precisión lleno igual que en el caso anterior.
- **Peso del aceite esencial:** Vaciar el picnómetro, luego enjuagar y secar como en el inicio. Efectuar las mismas operaciones solo que esta vez será con aceite esencial en lugar de agua.

EXPRESIÓN DE RESULTADOS:

La densidad relativa d_{20}^{20} se la expresa con la siguiente fórmula:

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Dónde:

d_{20}^{20} : Densidad relativa a 20°C, referido al agua a 20°C.

m_0 : masa en gramos del picnómetro vacío.

m_1 : masa en gramos del picnómetro con agua.

m_2 : masa en gramos del picnómetro con aceite esencial.

Se expresarán los resultados con tres decimales.

ANEXO 3

DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

PRINCIPIO:

Según el tipo de aparato que utilice, la medida directa del ángulo de refracción o la observación del límite de refracción total. El aceite se mantendrá dentro de las condiciones de iso-tropismo y de transparencia.

DEFINICIÓN:

El Índice de Refracción de un aceite esencial es el producto entre el seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción de un rayo luminoso de longitud de onda determinada, que pasa desde el aire a través del Aceite Esencial, manteniendo la temperatura constante.

La longitud de onda específica es (589.3 ± 0.3) nm, correspondiente a la radiación D1 y D2 del espectro de sodio.

La temperatura de referencia es de 20°C, salvo para los aceites esenciales que no son líquidos a esa temperatura. En este caso se deben adoptar las temperaturas de 25 y 30 °C según el punto de fusión del aceite considerado.

APARATOS:

Refractómetro: Utilicé un refractómetro clásico que permita la lectura de los índices de refracción entre: 1.300 y 1.700 o con una precisión de ± 0.0002 .

Ajusté el aparato de manera que a una temperatura de 20 °C, se tengan los siguientes índices de refracción según:

1.3330 para agua destilada.

1.4906 para el p-cimeno.

1.5685 para el benzoato de bencilo.

1.6585 para el 1-bromo naftaleno.

Los productos patrón deben ser puros, de calidad para refractometría, deben también ajustarse con una lámina de índice de refracción conocida, según las indicaciones de fabricación del equipo.

MODO DE OPERACIÓN:

Determinación

Pasar una corriente de agua en el refractómetro, a fin de mantener el aparato a la temperatura de referencia de 20°C salvo para los aceites esenciales que nos son líquidos a esa temperatura. En este caso deben adoptarse las temperaturas de 20°C y 30°C, según el punto de fusión del aceite esencial considerado. Esta temperatura no debe diferir de la temperatura de referencia más de ±0.2°C y debe mantenerse a ±0.2°C.

Antes de poner la muestra en el instrumento, llevarla a una temperatura igual a la que se realizará la medida. Para efectuar la lectura esperar que la temperatura sea estable.

Resultados:

Cálculos. El índice de refracción a la temperatura de referencia está dado por la fórmula.

$$n_D^{t'} = n_D^t + 0.0004 (t' - t)$$

Dónde:

n_D^t = valor de la lectura, obtenida a la temperatura t , o aquella a la que se ha efectuado la determinación.

F = factor de corrección (0.0004)

t' = temperatura a la que se efectuó la lectura

t = temperatura a 20°C

Nota:

Expresar los resultados con cuatro cifras decimales.

La precisión de la determinación es de ±0.0002.

ANEXO 4

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

INDICES DE KOVAST

- b) Adams, R. (2009). Identification of essential oil components by chromatography/MS Spectrometry. Vol. 4
- c) Aidi, W., Mhamdi, B., et al. (2009). Variations in essential oil and fatty acid composition during *Myrtus communis* var. *italica* fruit maturation. *Food Chemistry*, 112(3), 621-626. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.018>
- d) Saroglou, V., Marin, P. D., et al. (2007). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of six *Hypericum* species from Serbia. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(3), 146-152. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2006.09.009>
- e) Young, G., Chao, S., et al. (2007). Essential oil of *Bursera graveolens* (Kunth) Triana et Planch from Ecuador. *Journal of Essential Oil Research*, 19(6), 525-526. doi: 10.1080/10412905.2007.9699322
- f) Ruiz, S., Malagón, O., et al. (2010). Composition of the essential oils of *Artemisia sodiroi* Hieron., *Siparuna eggertii* Hieron., *Tagetes filifolia* Lag. and *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze from Loja Ecuador. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(6), 676-691. doi: 10.1080/0972060x.2010.10643879
- g) Saikia, A. K., Chetia, D., et al. (2013). Screening of fruit and leaf essential oils of *Litsea cubeba* Pers. from north-east India – chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Essential Oil Research*, 25(4), 330-338. doi: 10.1080/10412905.2013.775081
- h) Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., et al. (2003). Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Revista Académica de Colombia Cienc*, 27(105), 579-597.
- i) Sriti, J., Wannes, W., et al. (2011). Chemical composition and antioxidant activities of Tunisian and Canadian Coriander (*Coriandrum sativum* L.) Fruit. *Journal of Essential Oil Research*, 23(4), 7-15. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2011.9700462>

- j) Niu, L., Bao, J., et al. (2011). Odor properties and volatile compounds analysis of *Torreya grandis* Aril Extracts. *Journal of Essential Oil Research*, 23(4), 1-6. doi: 10.1080/10412905.2011.9700461
- k) Hachicha, S., Skanji, T., et al. (2007). Chemical composition of *Teucrium alopecurus* essential oil from Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*, 19(5), 413-415. doi: 10.1080/10412905.2007.9699939
- l) Argyropoulou, C., & Skaltsa, H. (2012). Identification of essential oil components of *Marrubium thessalum* Boiss. & Heldr., growing wild in Greece. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 26(7), 593-599. doi: 10.1080/14786419.2010.535153
- m) Frizzo, C., Atti-Serafini, L., et al. (2008). Essential oil variability in *Baccharis uncinella* DC and *Baccharis dracunculifolia* DC growing wild in southern Brazil, Bolivia and Uruguay. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(2), 99-106. doi: 10.1002/ffj.1862
- n) Brophy, J. J., Goldsack, R. J., et al. (2004). Essential oils from the leaves of the Australian species of *Palmeria* (Monimiaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 16(4), 312-317. doi: 10.1080/10412905.2004.9698730
- o) Rabehaja, D., Ihandriharison, H., et al. (2011). Combined analysis by GC(RI), GC-MS and ¹³C NMR of the essential oil from *Tana bojeriana* (Apiaceae), an endemic species of Madagascar. *Analytical Chemistry Letters*, 1(2), 130-134. doi: 10.1080/22297928.2011.10648211
- p) Mecherara, S., Hassani, A., et al. (2008). Composition and chemical variability of the essential oil from *Pistacia lentiscus* L. Growing Wild in Algeria: Part II: Fruit Oil. *Journal of Essential Oil Research*, 20(2), 104-107. doi: 10.1080/10412905.2008.9699965
- q) Maggio, A., Bruno, M., et al. (2013). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oils from *Pimpinellatragium* Vill. subsp. *glauca* (C. Presl.) C. Brullo & Brullo (Apiaceae) growing wild in Sicily. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 27(24), 2338-2346. doi: 10.1080/14786419.2013.841688
- r) Mazzoni, V.; Tomi, F.; Casanova, J., A daucane-type sesquiterpene from *Faucus carota* seed oil, *Flavour Fragr. J.*, 1999, 14, 5, 268-272. [doi:10.1002/(SICI)1099-1026(199909/10)14:5<268::AID-FFJ823>3.0.CO;2-Z]

- s) Pino, J., Rodríguez, D., et al. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Nectandra antillana* Meisn. leaves from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*, 26(5), 359-362. doi: 10.1080/10412905.2014.933448
- t) Özek, G., Özek, T., et al. (2006). Comparison of the essential oils of *Prangos turcica* A. Duran, M. Sagioglu et H. Duman Fruits obtained by different isolation techniques. *Journal of Essential Oil Research*, 18(5), 511-514. doi: 10.1080/10412905.2006.9699156
- u) Cozzani, S., Muselli, A., Desjobert, J.-M., Bernardini, A.-F., Tomi, F., and Casanova, J. 2005. Chemical composition of essential oil of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.) from Corsica. *Flavour Fragr. J.* 20:436-441.9
- v) Lesueur, D., Bighelli, A., et al. (2009). Composition of the essential oil of *Piper bavinum* C. DC. from Vietnam. *Journal of Essential Oil Research*, 21(1), 16-18. doi: 10.1080/10412905.2009.9700095
- w) Massarany, S. M., Abbas, F. A., et al. (2008). Chemical composition and biological evaluation of the essential oil of *Commiphora opobalsamum* L. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 13(4), 111-121. doi: 10.1080/10496470801946133
- x) Chalchat, J.-C., Maksimovic, Z. A., et al. (2004). Essential oil of *Acinos hungaricus* (Simonkai) Silic, Lamiaceae. *Journal of Essential Oil Research*, 16(1), 38-39. doi: 10.1080/10412905.2004.9698646