



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Determinación de las propiedades físicas, composición química,
evaluación de la actividad biológica y antioxidante del aceite esencial
del fruto Copal (*Dacryodes peruviana*) de la provincia de Zamora
Chinchipe.**

TRABAJO DE TITULACION.

AUTOR: Andrade González, Amada Nathaly

DIRECTOR: Valarezo Valdez, Benito Eduardo, Ph.D

LOJA – ECUADOR

2016



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2016

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D.

Benito Eduardo Valarezo Valdez.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: **“Determinación de las propiedades físicas, composición química, evaluación de la actividad biológica y antioxidante del aceite esencial del fruto *Dacryodes peruviana* de la provincia de Zamora Chinchipe”**, realizada por Amada Nathaly Andrade González, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Julio 2016

f.....

DECLARACION DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Amada Nathaly Andrade González declaro ser autora del presente trabajo de titulación: **“Determinación de las propiedades físicas, composición química evaluación de la actividad biológica y antioxidante del aceite esencial del fruto *Dacryodes peruviana* de la provincia de Zamora Chinchipe”**, 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: “Formar parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f) _____

Amada Nathaly Andrade González

1104738180

DEDICATORIA

A ti que un día respiraste para mí, que me albergaste en tu corazón y en tu vientre, a ti madre mía que secaste mis lágrimas y que por consolarme contenías las tuyas mientras me animabas avanzar, a ti que cuando pensé que el cielo se me caía en pedazos, me demostraste que eran nubes que venían ayudarme para subirme y tocar el cielo, a ti madre mía que sonreíste y te enojaste con mis locuras, que siempre estuviste ahí, porque sin tí, nada de esto hubiese sido posible, tú mi fortaleza, tú mi bastón...

A ti mi pequeña gigante, mi cúmulo de dulzura infinita, que trastocaste mis días, aquel angelito que un día normal lo hizo parecer como el más temeroso de mi vida, pero al pasar el tiempo se convirtió en esa mezcla, donde se fundió la tristeza, la soledad y se transformó en esa combinación sublime donde conjugan la alegría, los sueños, la inspiración y la felicidad; por eso, esta parte de mi vida y este sueño te lo dedico a ti mi princesita, a ti mi Isabelita...

AGRADECIMIENTO

“No es porque las cosas sean difíciles que no nos atrevemos; es porque no nos atrevemos que son difíciles” Lucio Anneo Séneca

Culminar esta etapa es sinónimo de vivir y por tal razón dando prioridad tengo que agradecer a Dios por haberme dado la vida y darme a mis padres, que con sus aciertos y errores forjaron en mí a una mujer que va en busca de sus sueños, que al caer tiene que aprender a levantarse.

A mis abuelitos, que son parte esencial de mis aprendizajes.

A mis hermanos por haber batallado juntos las dificultades que encontramos en el camino.

A mi hija porque su sonrisa me inspira, me levanta y me transforma...

Gracias a todos aquellos que dijeron que no podía, que fueron barricadas en vez de ser catapultas, gracias a ellos, porque entendí que sí podía hacerlo, porque siempre tuve las personas correctas y necesarias a mí alrededor.

Son muchas amigas que anduvieron conmigo en mis aventuras de Universidad que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí.

Agradezco de manera especial a mi director de Tesis Ph.D Eduardo Valarezo, por su ayuda y motivación brindada para realizar este proyecto; una gran persona, un excelente profesor. Dios lo bendiga siempre.

Mil gracias a todos por acompañarme en este caminar...

INDICE DE CONTENIDOS

CARATULA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACION DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO	v
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPITULO I	5
MARCO TEORICO	5
1.1. Aceites esenciales.	6
1.1.1.Extracción.....	6
1.1.2. Clasificación de los aceites esenciales.....	7
1.1.3. Caracterización.....	7
1.1.3.1. Características físicas	7
1.1.3.2. Características químicas.....	8
1.1.4. Propiedades.	8
1.1.5. Usos y aplicaciones.....	9
1.2 Cromatografía de gases.....	10
1.3. Actividad biológica.	12
1.3.1. Bacterias.....	12
1.3.1.1. Bacterias Gram Positivas.....	13
1.3.1.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	13
1.3.1.1.2. <i>Enterococcus faecalis</i> :	13
1.3.1.2. Bacterias Gram Negativas	14
1.3.1.2.1. <i>Escherichia coli</i> :	14
1.3.1.2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> :	14
1.3.1.2.3. <i>Pseudomona aeruginosa</i> :	15

1.3.1.2.4. <i>Proteus vulgaris</i> :	15
1.3.1.2.5. <i>Salmonella tiphymurium</i> :	16
1.4 Actividad antioxidante	16
1.4.1. Método ABTS (2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico))	17
1.4.2. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)	17
1.5. Plantas medicinales.	17
1.6. Flora ecuatoriana.	19
1.6.1. Flora aromática del Ecuador.	20
1.7. La familia Burseraceae.	20
1.7.1. El género <i>Dacryodes</i> .	22
1.7.1.1. <i>Dacryodes peruviana</i> .	22
1.7.1.2. Taxonomía de la especie <i>Dacryodes peruviana</i> .	23
CAPITULO II	25
MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1. Metodología	26
2.1.1. Recolección de la materia vegetal.	27
2.1.2. Determinación de la humedad.	28
2.1.3. Extracción del aceite esencial.	28
2.1.3.1. Determinación del rendimiento.	30
2.1.4. Determinación de las propiedades físicas	30
2.1.4.1. Densidad relativa.	30
2.1.4.2. Índice de refracción.	31
2.1.4.3. Actividad óptica.	31
2.1.5. Determinación de la composición química del aceite esencial.	32
2.1.5.1. Cromatografía de gases.	32
2.1.6. Determinación de la actividad biológica del aceite esencial de <i>Dacryodes peruviana</i> .	39
2.1.6.1 Microorganismos empleados.	39
2.1.6.2. Prueba utilizada para evaluar la actividad antibacteriana.	39

2.1.6.2.3. Preparación del cultivo bacteriano “Cultivo Overnight”	40
2.1.7. Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial del fruto de <i>Dacryodes peruviana</i>	43
2.1.7.1 Preparación de la muestra de aceite esencial del fruto de <i>D. peruviana</i>	43
2.1.7.2. Método capacidad de atrapamiento del catión – radical ABTS+	44
2.1.7.3. Método radical DPPH.....	46
2.1.7.4. Análisis de los datos obtenidos mediante ABTS+ y DPPH.....	47
CAPITULO III	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
3.1. Determinación de humedad del fruto de <i>Dacryodes peruviana</i>	49
3.2. Determinación de rendimiento.....	49
3.3. Determinación de las propiedades físicas del aceite esencial.	50
3.3.1. Densidad del aceite esencial.	51
3.3.2. Índice de refracción del aceite esencial.....	52
3.3.3. Actividad óptica específica del aceite esencial.	52
3.4. Compuestos químicos del esencial <i>D. peruviana</i>	53
3.4.1. Análisis cualitativo y cuantitativo.....	53
3.5. Actividad biológica del aceite esencial del fruto <i>Dacryodes peruviana</i>	61
3.5.1 Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana.	62
3.6. Actividad antioxidante del aceite esencial del fruto <i>Dacryodes peruviana</i>	64
3.6.1. Método ABTS ⁺	64
3.6.1.1. Lectura de los estándares Trolox/BHT.	64
3.6.1.2. Lectura de las muestras del aceite esencial.....	65
3.6.2. Método radical DPPH.....	65
3.6.2.1. Lectura de los estándares Trolox/BHT.	65
3.6.2.2. Lectura de las muestras del aceite esencial.....	66
CONCLUSIONES	68
RECOMENDACIONES	69
BIBLIOGRAFÍA	70

ANEXOS	78
ANEXO I	79
DETERMINACIÓN DE HUMEDAD RELATIVA	79
ANEXO II	80
DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO	80
ANEXO III	81
DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA A 20°C	81
ANEXO IV	83
DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN	83
ANEXO V	85
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ÓPTICA.....	85
ANEXO VI	88
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS INDICE DE KOVATS	88
ANEXO VI	90
PORCENTAJE DE AREA	90
ANEXO VII.....	93
INDICE DE KOVATS.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático de un cromatógrafo de gases	11
Figura 2. Detector de ionización de llama	11
Figura 3. <i>S. aureus</i>	13
Figura 4. <i>E. faecalis</i>	13
Figura 5. <i>E. coli</i>	14
Figura 6. <i>K. pneumoniae</i>	14
Figura 7. <i>P. aeruginosa</i>	15
Figura 8. <i>P. vulgaris</i>	15
Figura 9. <i>S. typhi</i>	16
Figura 11. Muestra botánica de la especie <i>Dacryodes peruviana</i>	24
Figura 10. Especie <i>Dacryodes peruviana</i>	24
Figura 12. Esquema del desarrollo de la investigación.....	26
Figura 13. Área de recolección de la especie <i>Dacryodes peruviana</i>	27
Figura 14. Muestra recolectada (fruto <i>D. peruviana</i>)	28
Figura 15. Proceso de destilación.....	29
Figura 16. Recolección del aceite esencial	30
Figura 17. Almacenamiento y etiquetado del aceite esencial	30
Figura 18. Polarímetro digital.....	31
Figura 19. Celda del polarímetro	31
Figura 20. Cromatógrafo de gases	33
Figura 21. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna no polar (DB-5MS)....	34
Figura 22. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna polar (HP-INNOWAX)35	
Figura 23. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna no polar (DB-5MS) acoplada a un detector de ionización de llama (FID).....	37
Figura 24. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna polar HP-INNOWAX acoplada a un detector de ionización de llama (FID).....	38
Figura 25. Modelo de Microplaca IC96 para bacterias con las concentraciones de aceite (µg/mL).	42
Figura 26. Espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS Scanning 333907	43
Figura 27. Muestras del aceite esencial D. peruviana analizadas mediante el método ABTS+.	45
Figura 28. Muestras del aceite esencial D. peruviana analizadas mediante el método DPPH.	47
Figura 29. Perfil cromatográfico del aceite esencial D, peruviana en la columna no polar DB- 5ms	53
Figura 30. Perfil cromatográfico del aceite esencial D, peruviana en la columna polar HP-Innowax.....	54
Figura 31. Compuestos mayoritarios en la columna no polar (DB5-ms).....	57
Figura 32. Compuestos mayoritarios en la columna polar (HP-Innowax).	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos de prueba.....	39
Tabla 2. Medios de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada bacteria.	40
Tabla 3. Volumen necesario para cada dilución de aceite.	44
Tabla 4. Volumen necesario para cada dilución de Trolox y BHT.	45
Tabla 5. Porcentaje de humedad de la materia vegetal.....	49
Tabla 6. Rendimiento en % v/p del aceite esencial del fruto <i>Dacryodes peruviana</i>	50
Tabla 7. Densidad relativa del aceite esencial <i>D. peruviana</i>	51
Tabla 8. Índice de refracción del aceite esencial <i>D. peruviana</i>	52
Tabla 9. Actividad óptica del aceite esencial <i>D. peruviana</i>	52
Tabla 10. Composición química del fruto <i>D. peruviana</i>	55
Tabla 11. Comparación de la cantidad relativa (%) de los compuestos químicos del aceite esencial por CG-MS y CG-FID.....	59
Tabla 12. CMI antibacteriana (mg/mL) del aceite esencial frente a 7 cepas bacterianas	62
Tabla 13. Datos del método ABTS+ para los estándares TROLOX y BHT.	64
Tabla 14. Datos del método ABTS+ para el aceite esencial.	65
Tabla 15. Datos del método DPPH para los estándares TROLOX y BHT.....	66
Tabla 16. Datos del método DPPH para el aceite esencial	66

RESUMEN

El aceite esencial del fruto *Dacryodes peruviana* se obtuvo mediante hidrodestilación, se determinó su composición química por cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría 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 44 compuestos que representan un 98,37% del aceite esencial, los componentes más representativos fueron: α -Phellandrene (50,32%), Limonene (23,03%), β -Phellandrene (8,27%), Terpinolene (5,23%), p-Cymene (3,06%), β - Pinene (2,57%) y Sabinene (1,44%). La densidad fue de 0,846 g/cm³, el índice de refracción de 1,4751 y la actividad óptica de +12,154. El aceite esencial presentó una actividad biológica débil frente a *Staphylococcus aureus* con una CMI de 0,625mg/mL mientras que las demás cepas bacterianas fueron inactivas. El aceite esencial de esta especie no presentó actividad antioxidante a las diferentes concentraciones evaluadas.

PALABRAS CLAVES: *Dacryodes peruviana*, hidrodestilación, cromatografía de gases, ABTS⁺, DPPH, CMI

ABSTRACT

The essential oil from the *Dacryodes peruviana* fruit was obtained through hydrodistillation. The chemical composition is determined by gas chromatography coupled with mass spectrophotometry and by flame ionization detector. Biological activity was evaluated by broth microdilution method and the antioxidant activity by two spectrophotometric methods: ABTS+ and DPPH. Oil physical properties were also determined 44 compounds components were identified representing 98,37% of the essential oil. The most representative components were: α -Phellandrene (50,32%), Limonene (23,03%), β -Phellandrene (8,27%), Terpinolene (5,23%), p-Cymene (3,06%), β - Pinene (2,57%) and Sabinene (1,44%). The density was 0,846 g/cm³, refractive index was 1,4751 and optical activity +12,154. The essential oil presented a weak biological activity in front of *Staphylococcus aureus* with a MIC of 0,625mg/mL, while other bacterial were inactive. The essential oil for this species did not present antioxidant activity for the different evaluated concentrations.

KEYWORDS: *Dacryodes peruviana*, hydrodistillation, gas chromatography, ABTS+, DPPH, MIC.

INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas medicinales para curar algunos malestares de la salud es una práctica muy común en muchos países (Muñetón, 2009). Desde la antigüedad se utiliza remedios naturales, elaborados a partir de los experimentos de Pitágoras, Galeno e Hipócrates y de las investigaciones de los médicos y herboristas recogidas a lo largo de los siglos. En los países en desarrollo, muchas personas satisfacen sus necesidades saludables con plantas medicinales. En Europa y América, ha renacido el interés por los productos naturales, estimulado por un mayor conocimiento de la acción de las plantas (Wills, 2002).

En las últimas décadas se ha demostrado 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 posibilidad poseerán en la próxima década se encuentran los aceites esenciales y sus constituyentes provenientes de diferentes especies vegetales (Acevedo et al., 2013).

Por ende, 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, procedentes en su mayoría del metabolismo de organismos vegetales (Pino et al., 2009)

Esta investigación está enfocada en el fruto de *Dacryodes peruviana* una especie de la familia Burseraceae. Conocida comúnmente como Copal, es un árbol que crece en los bosques húmedos de Colombia, Perú y Ecuador. El mesocarpio del fruto maduro es comestible y es consumido abundantemente por poblaciones indígenas. (Flores, 1988).

El fruto de *Dacryodes peruviana*, aún no reporta estudios de la composición química, actividad biológica y actividad antioxidante, en lo que respecta al aceite esencial, por esta razón es significativo el estudio de dicha especie con el fin de aportar información para futuros estudios y aplicaciones a nivel industrial y farmacéutico.

En el presente estudio se determinó la composición química, propiedades físicas, actividad biológica y antioxidante del aceite esencial del fruto *D. peruviana* del cantón Yacuambi. Se desarrolla en 3 capítulos, el primer capítulo titulado Marco Teórico, en el segundo capítulo se da a conocer los materiales y métodos utilizados para llevar a cabo la investigación y en el capítulo 3 se expone y analiza los resultados.

Esta investigación contribuye al estudio de la flora aromática de la Región Sur del Ecuador que se desarrolla 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 del fruto de *D. peruviana* mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-EM) y al detector de ionización de llama (GC-FID), utilizando dos tipos diferentes de columnas, DB-5MS y HP-INNOWAX. Las propiedades físicas como la densidad, índice de refracción y actividad óptica del aceite esencial, conjuntamente determinar si esta especie vegetal tiene potencial antimicrobiano mediante el método de microdilución en caldo que evalúa la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la actividad antioxidante de dicha especie mediante dos métodos espectrofotométricos: capacidad de atrapamiento del catión-radical ABTS⁺ y del radical DPPH.

CAPITULO I
MARCO TEORICO

1.1. Aceites esenciales.

Un aceite esencial es una mezcla de sustancias orgánicas volátiles, pertenecientes a diferentes clases de compuestos como: ésteres, alcoholes, hidrocarburos, aldehídos, fenoles y sus derivados, lactonas; todos son productos de los llamados metabolitos secundarios de las plantas como consecuencia del metabolismo vegetal (Bandoni, 2000).

El aceite esencial o esencia puede estar presente en distintas partes de la planta tales como en hojas, tallos, flores y frutos. Como ejemplo el aceite de rosa y jazmín se encuentra en las flores; hojas el aceite de eucalipto y menta; el alcanfor en los leños y el de los cítricos en los frutos (Dudareva & Pichersky, 2006).

La mayor parte de aceites esenciales son de olor agradable. El olor se debe básicamente a los compuestos que contiene la planta de la que se lo extrae. No todas las plantas tienen aceites esenciales y muchas de ellas tienen una pequeña cantidad que hace muy complicada la extracción del mismo (Pozo & Naranjo, 2006).

Los aceites esenciales de plantas aromáticas o partes de ellas son obtenidos por arrastre con vapor de agua; ocupan un papel importante en los mercados farmacéuticos, perfumería, cosmetología y la agro-industria (Bruneton, 1991).

1.1.1. Extracción.

Dependiendo de la aplicación, la clase de la planta y la parte que se utilice para la extracción de los aceites esenciales se tienen varias técnicas de extracción, siendo los obtenidos por arrastre de vapor los de más alta calidad para uso medicinal y terapéutico por su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada (Olaya & Méndez, 2003)

En el método de destilación por arrastre con vapor de agua, la materia prima vegetal generalmente fresca es cargada en un hidrodestilador, de modo 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 arrastrado y posteriormente condensado (Martínez, 2001; Rodríguez et al., 2012).

A la salida del condensador, se adquiere una emulsión líquida inestable, que es separada en un florentino (Rodríguez et al., 2012).

1.1.2. Clasificación de los aceites esenciales

Se clasifican con base en diferentes criterios. De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en:

- *Esencias fluidas*: son líquidos volátiles a temperatura ambiente.
- *Bálsamos*: son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización.
- *Oleorresinas*: tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (Martínez, 2003)

De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como:

- *Naturales*: se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores.
- *Artificiales*: se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes.
- *Sintéticos*: como su nombre lo indica son los producidos por procesos de síntesis química (Martínez, 2003).

1.1.3. Caracterización

1.1.3.1. Características físicas

La caracterización física de los aceites esenciales es muy significativa para determinar el rendimiento del aceite esencial de cada recolección usando la relación entre el volumen de aceite esencial obtenido y la masa de la muestra vegetal. También se determina el índice de refracción, humedad relativa, densidad, actividad óptica y propiedades sensoriales como olor, color y sabor. Los aceites esenciales son volátiles y son líquidos a temperatura ambiente, con frecuencia tienen una coloración que va desde incoloro-amarillo pálido a verde esmeralda. Son más ligeros que el agua. Los aceites esenciales cambian rápidamente de un líquido a un estado gaseoso; son fácilmente inflamables y queman con una llama brillante (Baiz, 1999).

Son solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos habituales, como éter o cloroformo y en alcohol etílico de alta gradación. Son liposolubles y muy poco solubles en agua, pero son arrastrables por el vapor de agua (Martínez, 2003).

1.1.3.2. Características químicas.

Un aceite esencial es una mezcla de varias sustancias químicas diferentes (aldehídos, fenoles, óxidos, ésteres, cetonas, alcoholes y terpenos) que dan el aroma característico de algunas flores, árboles, frutos, hierbas, especias, semillas. Las características químicas del aceite esencial se basan en la identificación del número de compuestos presentes en el aceite esencial y el porcentaje que representa a cada uno de estos. (Taiz & Zeiger, 2002).

Los componentes de los aceites se clasifican en:

- **Hidrocarburos terpénicos:** terpenos y terpenoides.
- **Aldehídos:** aldehído benzoico, aldehído cinámico, butanal, propanal.
- **Ácidos:** acético, palmítico.
- **Alcoholes:** linalol, geraniol, mentol.
- **Fenoles:** anetol, eugenol.
- **Ésteres:** acetato de linalilo, acetato de geranilo.
- **Cetonas:** tuyona (Ríos, 2007).

1.1.4. Propiedades.

Los aceites esenciales presentan propiedades que son beneficiosas para el ser humano y por lo tanto son valorizados en el mundo cuando son de origen natural. Las propiedades del aceite esencial dependen de la procedencia del aceite, de la forma de extracción y de sus componentes (Berger, 2007).

Cada aceite esencial contiene propiedades específicas de la planta de la que se obtiene, cuyos componentes químicos nos servirán para distintas finalidades. Por ejemplo, un aceite esencial puede ser sedante (jasmín) mientras que otro tiene capacidad para estimular el sistema nervioso (romero). Unos destacan por sus propiedades bactericidas (tomillo), mientras que otros tienen mayor capacidad analgésica (menta) (Carbonnel, 1998).

1.1.5. Usos y aplicaciones

Los aceites esenciales son productos con “alta actividad terapéutica”, por lo tanto son usados en la industria farmacéutica. En cosmética se utilizan en la fabricación de perfumes corporales, ambientadores, aromas. En la industria alimenticia se usa como saborizantes para condimentos, licores, dulces, golosinas, etc. (Ryman, 1995).

En la actualidad diferentes industrias emplean los aceites esenciales para impartir aroma, siendo la industria de perfumería la más importante. A continuación se mencionan algunas de las industrias que emplean los aceites esenciales con este fin (Plaza, 2011).

- **Perfumes:** para acentuar las notas de superficie, media o corazón y base o baja de perfumes, aguas de perfume, aguas de tocador, aguas de colonia, aguas frescas y aguas de baño.
- **Cosméticos:** para hacer más agradable, atractivo o impartir identidad a un producto cosmético: jabones, champús, desodorantes, labiales, cremas, ungüentos, pastas dentales.
- **Aseo y Limpieza:** para otorgar fragancia a productos de limpieza personal, limpieza para el piso, aromatizantes ambientales, limpieza de baños, cocinas, etc.
- **Plásticos:** para enmascarar el mal olor que tienen algunos cauchos y plásticos. De esta forma se le imparte olor a los juguetes, bolsas, entre otros.
- **Textiles:** como enmascaradores de olores en tratamientos con mordientes antes y después del teñido.
- **Pinturas:** como enmascaradores de olores de las pinturas y barnices. Papelería: para impregnar de fragancias cuadernos, esquelas, tarjetas, papel higiénico, toallas faciales y sanitarias, etc.
- **Farmacológicas:** Algunos aceites esenciales se utilizan en farmacia para la obtención de diversos principios activos o como excipientes y aromatizante en la preparación de jarabes, suspensiones y otras formas farmacéuticas (Plaza, 2011).

1.2 Cromatografía de gases.

Durante los últimos años se ha demostrado que una de las técnicas más eficiente para el estudio de la composición de los aceites esenciales es la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM). Es una técnica muy conveniente para la caracterización debido a que los componentes del aceite son compuestos volátiles y de bajo peso molecular (Bandoni, 2002).

La cromatografía de 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 muestra constituida por una mezcla que contiene el compuesto deseado en el solvente que es generalmente un gas inerte como el helio, nitrógeno o hidrogeno a través de una fase estacionaria que se encuentra fijada en una columna. La fase estacionaria retrasa el paso de los componentes de la muestra, de forma que los componentes la atraviesan a diferentes velocidades y se separan en el tiempo. Cada uno de los componentes de la mezcla presenta un tiempo característico de paso por el sistema, denominado tiempo de retención (Gutiérrez, 2002).

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, que puede ser Helio (He), Nitrógeno (N_2) o Hidrogeno (H_2O) y los analitos después de separados llegan al detector, cuya respuesta aparece en la pantalla de un ordenador. 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)

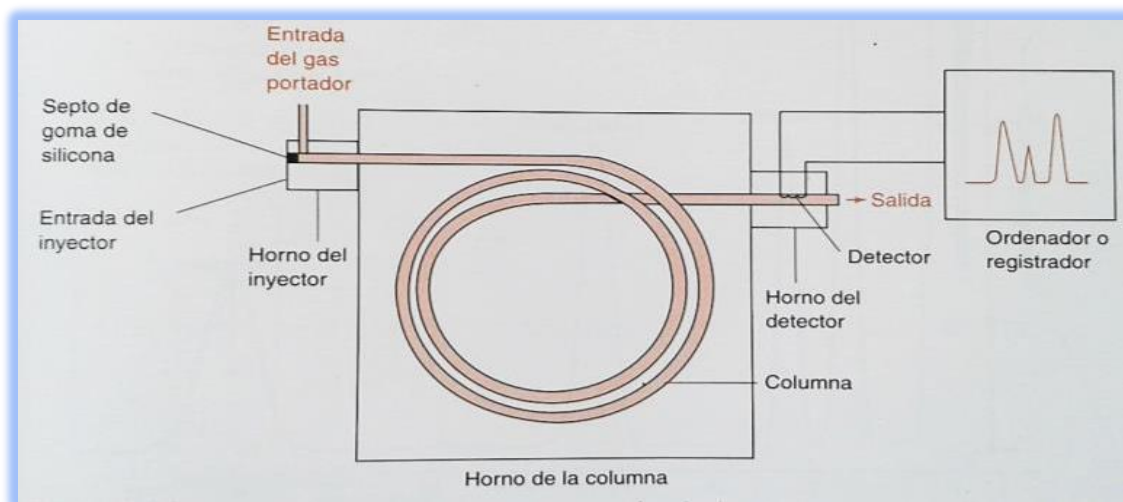


Figura 1.Diagrama esquemático de un cromatógrafo de gases
Fuente: Harris, 2007

Entre los detectores más utilizados en cromatografía de gases es el detector FID (ionización de llama) que por su alta versatilidad, hace posible la detección de un elevado tipo de compuestos. 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 (Olguín, 2004).

En este detector la muestra se mezcla con una corriente de hidrogeno y luego llega a una llama de oxígeno e hidrógeno, donde se quema y produce iones que son conducidos a un colector de iones, gracias a un campo magnético de entre 200 y 300V, la corriente colectada es amplificada por un circuito de alta impedancia. Este tipo de detectores se operan a más de 250°C para evitar la condensación de agua y de muestras volátiles figura 2 (Miller, 1998).

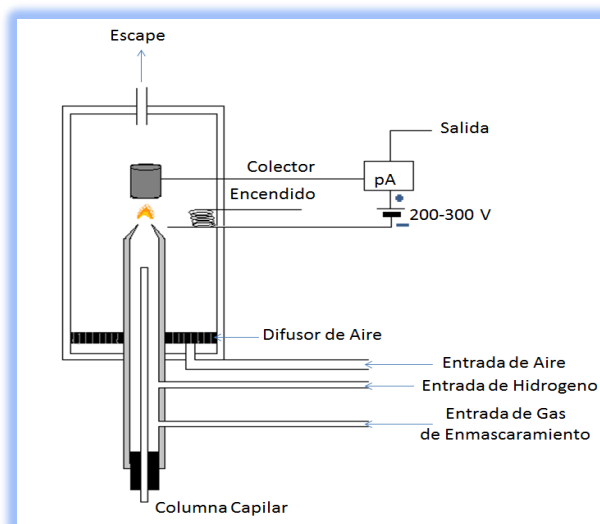


Figura 2.Detector de ionización de llama
Fuente: Miller, 1998

1.3. Actividad biológica.

La mayor parte de compuestos presentes en aceites esenciales obtenidos de diferentes plantas como: fenoles, flavonoides y otros polifenoles actúan frente a reconocidas bacterias patógenas. Las investigaciones farmacológicas de los aceites esenciales están fundamentados en las propiedades antioxidantes, antiinflamatoria, antifúngicas y antimicrobiana, a través de pruebas específicas como las pruebas de la actividad biológica (Baratta, 1998).

Algunas esencias son activas contra bacterias pero no contra hongos, mientras que otras provocan el crecimiento de estos microorganismos. Los terpenos que forman parte de los aceites esenciales son los que confieren sus propiedades inhibitoria frente a biológicas (Oliva, 2011).

Entre los organismos patógenos causantes de múltiples enfermedades infecciosas y que se evaluarán en la presente investigación se encuentran las bacterias Gram positivas como: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y bacterias Gram negativas: *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgares*, *Escherichia coli*, *Salmonella tiphymurium*.

1.3.1. Bacterias.

Las bacterias, son organismos unicelulares con vida independiente y con capacidad de reproducirse se caracterizan por presentar en su estructura dos ácidos nucleicos.

Generalmente tienen enzimas, proteínas complejas y estructuras especializadas así como una membrana celular que los separan del mundo circundante. Provocan cuando infectan al hombre lesiones localizadas o generalizadas de tipo inflamatorio (Antoni & Raimondo, 2005).

1.3.1.1. Bacterias Gram Positivas.

1.3.1.1.1. *Staphylococcus aureus*:



Figura 3. *S. aureus*

Fuente: Tortora, 2007

Es uno de los microorganismos de mayor importancia médica. Es un coco gram-positivo, no móvil. *S. aureus* tiene un alto grado de patogenicidad y es el responsable de una amplia gama de enfermedades. Es una bacteria que se encuentra en la piel y fosas nasales de las personas sanas, que causa gran variedad de infecciones menores de la piel y abscesos cutáneos hasta enfermedades que pueden poner en peligro la vida infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario y es el principal causante de infecciones nosocomiales. Actualmente las cepas de *S. aureus* tienen un amplio rango de resistencia a los antibióticos y se pueden encontrar cepas resistentes ultra resistentes (Bustos et al., 2006).

1.3.1.1.2. *Enterococcus faecalis*:



Figura 4. *E. faecalis*

Fuente: Tortora, 2007

Es un coco gram-positivo, inmóvil, puede ser un patógeno oportunista los tipos más comunes son las infecciones del tracto urinario. En los últimos años se ha desarrollado

un interés creciente por el género *Enterococcus*, debido a la mayor incidencia de infecciones hospitalarias graves que provoca, así como la resistencia a diversos agentes microbianos (Guevara et al., 2000)

1.3.1.2. Bacterias Gram Negativas

1.3.1.2.1. *Escherichia coli*:

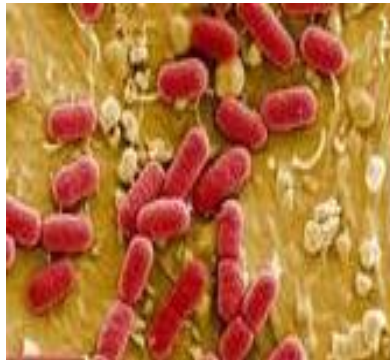


Figura 5. *E. coli*
Fuente: Tortora, 2007

Es un bacilo gram-negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, tribu Escherichia. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Rodríguez & Angeles, 2002).

1.3.1.2.2. *Klebsiella pneumoniae*:



Figura 6. *K. pneumoniae*.
Fuente: Tortora, 2007

Es un microorganismo patógeno oportunista colonizador de piel y mucosas de pacientes hospitalizados que pueden presentar infecciones invasoras como bacteriemias o septicemias. Usualmente las manos contaminadas del personal son el vehículo

responsable de brotes epidémicos. Esta bacteria es uno de los principales microorganismos causantes de infecciones intrahospitalarias (Andrade & Silva, 2004).

1.3.1.2.3. *Pseudomona aeruginosa*:



Figura 7. *P. aeruginosa*.
Fuente: Tortora, 2007

Es un patógeno oportunista causante de diferentes tipos de infecciones en los pulmones, vías respiratorias, vías urinarias y también causa otras sepsis (infecciones generalizadas en el organismo).

Esta bacteria muestra una resistencia intrínseca a diversos antimicrobianos: algunos β -lactámicos, aminoglucósidos, más recientemente a algunas quinolonas como la cilostina (Battle, 2005).

1.3.1.2.4. *Proteus vulgaris*:



Figura 8. *P. vulgaris*
Fuente: Tortora, 2007

Es un patógeno reconocido como agente etiológico de distintos procesos infecciosos, tales como infección de vías urinaria, neumonías, infecciones en heridas e infecciones óticas. Varias investigaciones mostraron la creciente implicancia del género en infecciones nosocomiales. *P. vulgaris* por lo general presenta resistencia a la ciprofloxacina y cefalotina (Castro, 2006).

1.3.1.2.5. *Salmonella tiphymurium*:



Figura 9. *S. typhi*
Fuente: Tortora, 2007

Es una bacteria anaeróbica facultativa, que puede en ocasiones sobrevivir en bajas condiciones de oxígeno *S. typhi* causa la fiebre tifoidea en humanos, quienes son sus únicos hospedantes (Uribe & Suárez, 2006).

1.4 Actividad antioxidante

“Un antioxidante es cualquier sustancia que cuando se encuentra presente en concentraciones pequeñas en relación con las de un sustrato oxidable, demora significativamente o previene la oxidación de dicho sustrato” (Patiño, 2006).

Las plantas contienen una gran variedad de componentes químicos o moléculas bioactivas, que pueden neutralizar los radicales libres como es el caso de los aceites esenciales (Sharafi et al., 2010).

Los aceites esenciales están conformados por un sin número de componentes que poseen actividad antioxidante, entre ellos están los terpenos, que son sustancias que actúan como antioxidantes protegiendo los lípidos, la sangre y demás fluidos corporales del ataque de radicales libres de especies del oxígeno, radicales hidroxilo, peróxido y superóxido (García, 2013).

Para determinar la actividad antioxidante se utilizan diversos métodos espectrofotométricos entre ellos los más usados son; ABTS(2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo o DPPH) (Kuskoski et al., 2005).

1.4.1. Método ABTS (2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

El método ABTS⁺; también se denomina ensayo TEAC por sus siglas en inglés: *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*. Este método se realiza usando un patrón que es Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico) (Granados et al., 2012), es una técnica que se usa para medir la capacidad antioxidante de un material biológico, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrofílica o lipofílica. Es el más indicado para evaluar la capacidad antioxidante de compuestos coloreados, como en el caso de las antocianinas, por presentar una absorbancia máxima próxima a la región infrarroja (754nm), reduciendo así, las posibilidades de interferencias de compuestos colorados que absorben en la región visible o de compuestos resultantes de reacciones secundarias (Salazar, 2009).

1.4.2. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)

El Fundamento del método desarrollado por Brand-Williams DPPH, consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante; la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 515nm (Castañeda et al., 2008).

La molécula de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) se caracteriza como un radical libre estable en virtud de la deslocalización del electrón libre durante la molécula como un todo, como sería el caso con la mayoría de otros radicales libres. La deslocalización también da lugar a que el color violeta oscuro, que se caracteriza por una banda de absorción en solución de etanol centrada en aproximadamente 520nm (Molyneux, 2004).

1.5. Plantas medicinales.

Las plantas medicinales son aquellos vegetales que elaboran productos llamados principios activos, los cuales son sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo. Su utilidad primordial a veces específica, es servir como droga o medicamento que alivie la enfermedad o restablezca la salud perdida; es decir, que tiende a disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico que es la enfermedad (Muñoz, 2002).

Las plantas medicinales han sido el recurso tradicional más importante del hombre para curar sus dolencias, en particular las infecciones microbianas y constituyen una importante fuente en la búsqueda de nuevos fármacos con dichas actividades farmacológicas, en especial por la creciente resistencia de los microorganismos a los fármacos actuales, a la aparición de nuevas especies patógenas, en especial de origen viral o fúngico (Soejarto & Gyllenhaal, 1997)

Numerosos estudios han demostrado que los antioxidantes naturales de plantas medicinales y aromáticas están afines con la reducción de enfermedades crónicas. Por tal motivo, los antioxidantes naturales aparecen como una alternativa interesante, en especial los aceites esenciales o los extractos obtenidos de plantas comestibles que pueden utilizarse como aditivos de los alimentos (Hui et al., 2006).

Existe un interés creciente en la medicina alternativa para la cura de numerosos padecimientos y enfermedades que afectan a los seres humanos, por lo que las investigaciones que tengan como objetivo el cultivo, estudio y procesamiento de plantas medicinales con fines terapéuticos se consideran estratégicas e importantes (Soto et al., 2002). En las comunidades carentes de servicios médicos, las parteras, los "yerberos" y los curanderos son los responsables de la salud de los pobladores. Incluso en lugares donde hay servicios médicos, los recursos de la medicina tradicional son utilizados por las personas enfermas. Existen grupos indígenas con grandes conocimientos de la herbolaria medicinal y del ambiente donde se desarrollan estas plantas. Tales conocimientos acumulados por muchas generaciones constituyen la base de la biodiversidad cultural global y del uso sustentable de estos recursos (Canales et al., 2006).

Sin embargo, en muchos países en desarrollo ha ocurrido una pérdida importante del conocimiento tradicional sobre el uso de plantas medicinales. Asociado a ello, la disponibilidad de estas se ha visto reducida por la degradación de bosques y su conversión a bosques secundarios y campos agrícolas. En consecuencia, la cadena de transmisión de dicho conocimiento se encuentra en riesgo. Es necesario, entonces, hacer esfuerzos para evitar la pérdida definitiva del conocimiento tradicional sobre plantas medicinales, no solo para preservar esta herencia cultural, sino también para registrar la información sobre ciertas especies útiles, que podrían ser relevantes para el desarrollo de nuevas fuentes de medicamentos y de otros beneficios para la humanidad, contribuyendo, al mismo tiempo, a proteger la biodiversidad (Bermúdez et al., 2005).

1.6. Flora ecuatoriana.

Constantemente se escucha que el Ecuador es un país megadiverso, sin embargo es necesario conocer qué implica esta definición, que va más allá de un número de plantas y animales, el concepto de biodiversidad es muy amplio porque abarca a todos los organismos vivos, cuya dotación y variabilidad genética los hace precisamente diferentes unos de otros, para que puedan desarrollarse y adaptarse a los diversos ecosistemas del planeta. El Ecuador presenta rasgos ecológicos propios como son su diversidad cultural, étnica, flora y fauna, topografía, suelos, variados climas, paisajes naturales que hacen del Ecuador, un sistema ecológico dinámico de considerables variaciones (Vargas, 2002).

El Ecuador situado en plena línea ecuatorial, a latitud cero es un país con gran riqueza cultural, natural y arqueológica en un espacio reducido (256.370 km²), posee una gran diversidad geográfica, biológica y étnica, donde convergen los Andes, Amazonía y la cuenca del Pacífico. (Coloma & Ron, 2001).

En lo que corresponde a las especies vegetales los datos finales le corresponden al trabajo denominado Catálogo de Plantas Vasculares del Ecuador, donde el número de especies aceptadas anotadas en el catálogo es 16.087. Esto incluye 595 especies introducidas y 186 especies que se esperan encontrar en el Ecuador. Por lo tanto existen 15.306 especies nativas documentadas, el número de especies endémicas es 4.173 o el 27,3% del número total de especies nativas.

Existen 2.110 géneros nativos en el Ecuador, un total de 390 géneros listados en el Catálogo corresponden a especies introducidas. Sólo el 85% o el 4% de los géneros están representados exclusivamente por especies endémicas. El número de géneros endémicos en el Ecuador es 23, de los cuales 12 son andinos, siete son de las Islas Galápagos, tres de la Costa y sólo uno de las tierras bajas de la Amazonía.

El número más alto de especies se encuentran en la región andina, con 9.865 especies o el 64,4% del total. La región de la costa está representada por 4.463 especies o el 29,2% y en la región amazónica se encuentran 4.857 especies o el 31,7%. En Galápagos solamente se encuentran 699 especies o el 4,6%. Es claro que la gran diversidad de plantas del Ecuador se debe en alto grado a la presencia de los Andes (Jorgensen & León- Yanez, 1999).

En el Ecuador se ha calculado que las especies de plantas vasculares podría llegar de 20.000 a 30.000, de las cuales pueden ser útiles de 5.000 a 8.000, contando con esta riqueza biológica y la población que la usa, en la actualidad se hace necesario proponer que las nacionalidades y pueblos indígenas revaloricen su milenaria sabiduría como una contribución ecológica, social, económica y cultural representativa para los otros seres humanos. Este conocimiento se tiene que respetar, ya que si bien estas poblaciones no conocen con exactitud los principios activos de las plantas, sí saben cómo emplearlos para que funcionen como antitumorales, antibióticos o esteroides, entre otras múltiples aplicaciones que tienen (Rios et al., 2007).

1.6.1. Flora aromática del Ecuador.

Las plantas medicinales y sus productos derivados, han sido milenariamente utilizados en la medicina tradicional y ahora son cada vez más valiosos como materia prima en la preparación de medicamentos modernos (occidentales) para la industria farmacéutica y herbal, cuyo mercado, igualmente importante, sigue una tendencia hacia un aumento significativo. Se estima que el mercado mundial de fármacos de origen vegetal es de aproximadamente 35 mil millones de dólares anuales (Dürbeck, 1996).

(Dürbeck, 1996) reporta el uso de aproximadamente 1.300 especies de plantas para medicinas y uso diario por parte de los indígenas de la Amazonía. Más de 90.000 especies de plantas de los bosques tropicales han sido estudiadas. Dichos bosques representan los almacenes principales de materia prima natural para la medicina moderna. Son miles los productos elaborados de plantas que sirven como analgésicos, antibióticos, hormonas y diuréticos, entre muchos otros usos.

1.7. La familia Burseraceae.

Son árboles o arbustos provistos de resina y a menudo de aceite esencial; hojas alternas, por lo general imparipinnadas, algunas veces bipinnadas, trifolioladas o reducidas a un solo folíolo, los folíolos laterales opuestos, generalmente sin estípulas; inflorescencias axilares o terminales, básicamente se presentan paniculadas, pseudoracimosas o fasciculadas, rara vez flores solitarias; flores casi siempre unisexuales, pequeñas, actinomorfas, trímeras, tetrámeras o pentámeras, rara vez hexámeras; cáliz más o menos cupuliforme, dividido en 3 a 5 segmentos connados o casi libres, valvados, contortos o abiertos en botón; pétalos 3 a 5, rara vez ausentes, libres o en pocos casos unidos para formar un tubo, contortos o valvados en botón;

estambres dispuestos en 1 o 2 verticilos, del mismo número que las divisiones del cáliz o con más frecuencia dos veces más numerosos, por lo general estériles en las flores femeninas (que a menudo dan la apariencia de ser hermafroditas), filamentos por lo común libres, insertos debajo o rara vez sobre el disco, anteras biloculares, con dehiscencia longitudinal, disco anular o cupuliforme, a veces inconspicuo; pistilo 1, el ovario súpero, 2 a 5–locular y de otros tantos carpelos, placentación axilar, óvulos 2 por cada lóculo, estilo corto o casi obsoleto, estigma 2 a 5–lobado; fruto drupáceo con pericarpio generalmente carnoso, pero a menudo finalmente dehiscente por medio de 2 a 5 valvas, huesos (endocarpios lignificados) 1 a 5, casi siempre monospermos y con frecuencia cubiertos por un pseudoarilo; semillas sin endospermo, embrión por lo común recto a curvo (Rzedowski & Guevara, 1992).

Estas plantas, de manera muy general se caracterizan por ser árboles de porte bajo a medio, muy ramificados con una altura aproximada de 5 a 20 metros y su corteza varía de gris, amarilla a roja dependiendo de las especies, debido a esto en algunos lugares se les conoce como cuajotes rojos o amarillos, algunas tienen la corteza exfoliante, son caducifolias en la temporada seca y florecen cuando comienzan las lluvias (Bonfil et al., 2007).

Familia de unos 20 géneros y más de 600 especies, distribuidas en las regiones tropicales del mundo, con mayor diversidad en América, el norte y sur de África y en Malasia. Desde el punto de vista económico algunas burseráceas son importantes por las resinas (copal) y los aceites esenciales que producen, utilizadas en ceremonias religiosas, en cosmetología y en la medicina popular (García, 2002).

Los aceites esenciales de las Burseras son fuente de numerosos compuestos químicos volátiles, entre los que destacan terpenos y terpenoides, parte importante de la trementina o aguarrás. En el pasado la trementina fue usada mayormente como un solvente, pero se emplea además para pinturas especiales, barnices y lacas; es también importante fuente de químicos refinados que son usados en perfumería, desinfectantes domésticos, líquidos limpiadores, y en la industria de alimentos modificándolos químicamente para producir esencias de cítrico y otras resinas de burseráceas se han empleado como sedantes, para calmar dolores de muelas, dolor de cabeza, para tratar afecciones estomacales y de las vías respiratorias, etc. (Aldama et al., 2010; Arias et al., 2000),

1.7.1. El género *Dacryodes*

Dacryodes es un género de plantas perteneciente a la familia Burseraceae, en los grupos de las angiospermas (plantas con flores). Comprende 77 especies descritas y de estas, solo 61 aceptadas (Forzza, 2010).

El término *Dacryodes* se deriva de la palabra griega 'Dakrun', que significa 'lágrima', en referencia a la resina o exudado formado sobre la superficie de la corteza. Hay aproximadamente 70 especies distribuidas en los bosques tropicales húmedos de América (22 especies y 14 especies no descritas), del Sur y África Central (18 especies) y el sudeste asiático (18 especies) (Onana, 2008).

El género *Dacryodes* tiene una amplia distribución geográfica en los neotrópicos crecen naturalmente en zonas tropicales de América, África y Asia. Es un árbol alto, de profundas raíces, sin refuerzos, permanentemente verde, su corteza es lisa, escamosa con albura pálida. Las flores son unisexuales. Los frutos presentan un pericarpio carnoso y grueso y es el que predomina en las áreas de bosques lluviosas (Goldstein, 1974).

Muchas especies de plantas *Dacryodes* están infrautilizados y se han utilizado en la medicina popular para el tratamiento de enfermedades, como las enfermedades de anemia, malaria, dolor de cabeza, fiebre y piel (Ajibesin et al., 2008; Dike et al., 2012).

Las especies *Dacryodes* tienen una larga historia de valor medicinal. A través de los siglos, estas especies han sido ampliamente utilizadas como etno-medicinal por las personas nativas para tratar enfermedades (Ndah et al., 2013).

1.7.1.1. *Dacryodes peruviana*.

El copal comestible, mijíllehe, uguna, guaná o tabonuco (*Dacryodes peruviana*) es un árbol de la familia de las burseráceas, que crece en los bosques húmedos de Colombia, Perú y Ecuador. Es un árbol de 14-18 m. de altura. Fuste recto con canales irregulares, 20-40 cm. Corteza externa pardo oscuro grisáceo a parto blancuzco. Hojas compuestas, imparipinnadas alternas, sin estípulas, de 23-40 cm. de largo y raquis alado en la base. Lamina de folíolos subcoriáceas a membranáceas, oblongo-elíptico, 8-18 cm. de largo y 4-7 cm. de ancho, márgenes enteros, ápice acuminado, base redondeada a obtusa, haz verde oscuro y glabro, envés verde claro, nervaciación conspicua en el envés; pecíolo corto de 0,6 - 0,8 cm. de longitud. Inflorescencia en panícula. Flores bisexuales.

El fruto es una drupa ovoide en promedio mide 3,3 cm. de largo, 2-4 cm. de diámetro y 1,24 cm. de espesor; pericarpio delgado 0,4 cm. de grosos (Flores, 1996).

El epicarpio y mesocarpio del fruto maduro son comestible. El sabor es agradable, ligeramente resinoso, es aromático y cremoso. Se ha observado, que el mesocarpio del fruto maduro tiene propiedades dispersantes sobre suspensión de almidón. La fauna silvestre, se alimenta del fruto. Otras partes de la planta La madera se utiliza en construcciones rurales, carpintería sencilla y como leña. El látex de su tronco se aplica sobre la piel para curar las varices, sus hojas preparadas en infusión ayudan a tratar el asma.

La fructificación se inicia a los 15 años de la plantación y se concentra en los meses de enero y febrero. El fruto es perecible a temperatura ambiente, 3-4 días después de la cosecha, el fruto se deteriora. En ambiente húmedo, puede conservarse 1 semana. No se conoce la composición química y valor nutritivo del epicarpio y mesocarpio; por el sabor y aroma, se asume contienen ácidos grasos y aceites esenciales (Flores, 1988).

1.7.1.2. Taxonomía de la especie *Dacryodes peruviana*.

Nombre Científico: *Dacryodes peruviana*

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Sapindales

Familia: Burseraceae

Género: *Dacryodes*

Epíteto Específico: *peruviana*

Autor Epíteto Específico: (Loes.) H.J. Lam

Determinador: Daly, D

Fecha determinación: 2010



Figura 11. Especie *Dacryodes peruviana*
Fuente: La autora.



Figura 10. Muestra botánica de la especie *Dacryodes peruviana*.
Fuente: La autora

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Metodología

La siguiente investigación se desarrolló bajo el siguiente esquema:

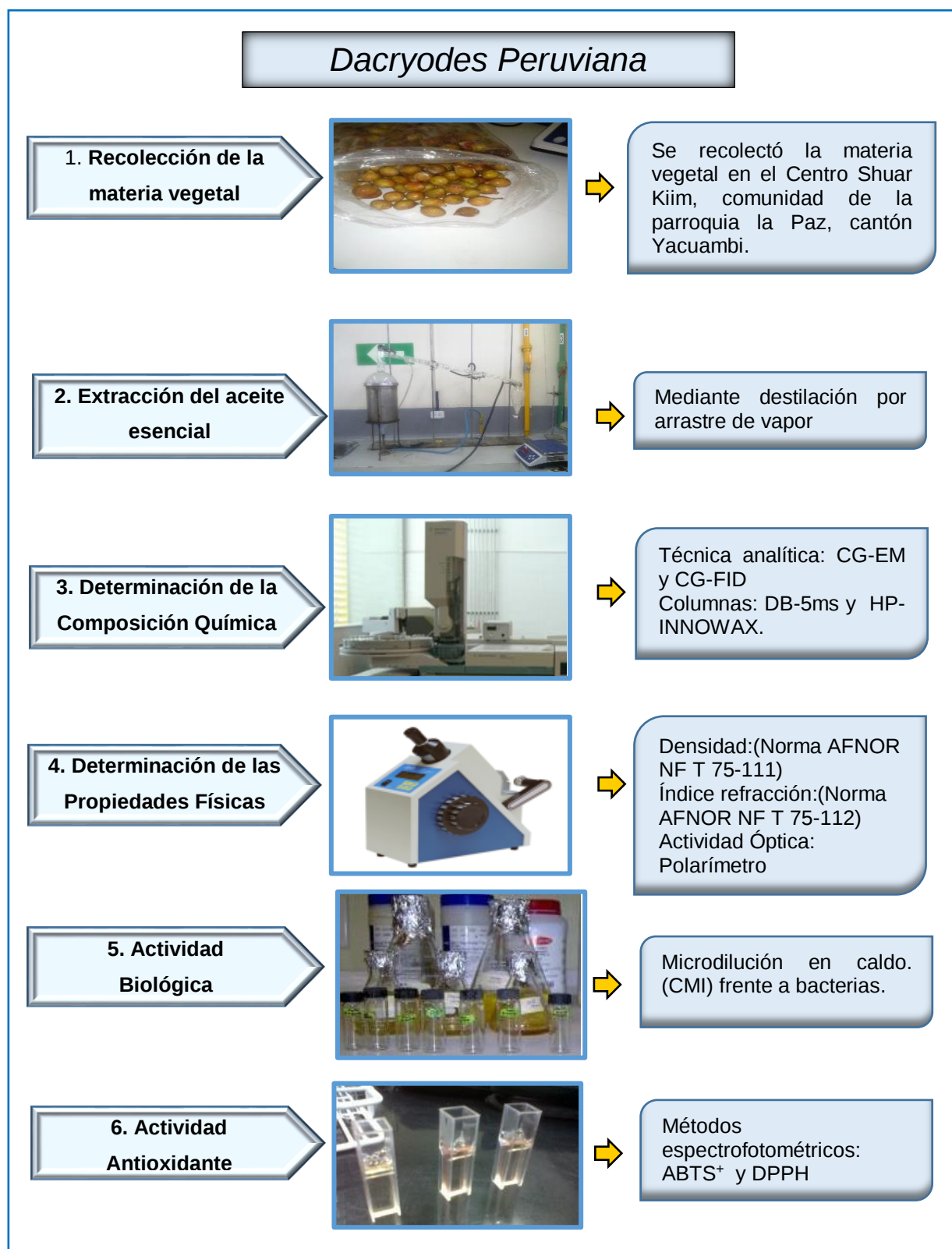


Figura 12. Esquema del desarrollo de la investigación.
Fuente: La autora

2.1.1. Recolección de la materia vegetal.

La recolección del material fresco de las partes aéreas de *D. peruviana* se llevó a cabo en la Centro Shuar Kiim, comunidad de la parroquia la Paz, cantón Yacuambi, provincia de Zamora Chinchipe, ubicada en la zona Sur del Ecuador en la región Amazónica. En la figura 13 se observa la ubicación geográfica de dicha especie con las siguientes coordenadas: latitud 170732457E, longitud 9582196N y altura 890.2m s.n.m. (sobre el nivel del mar).

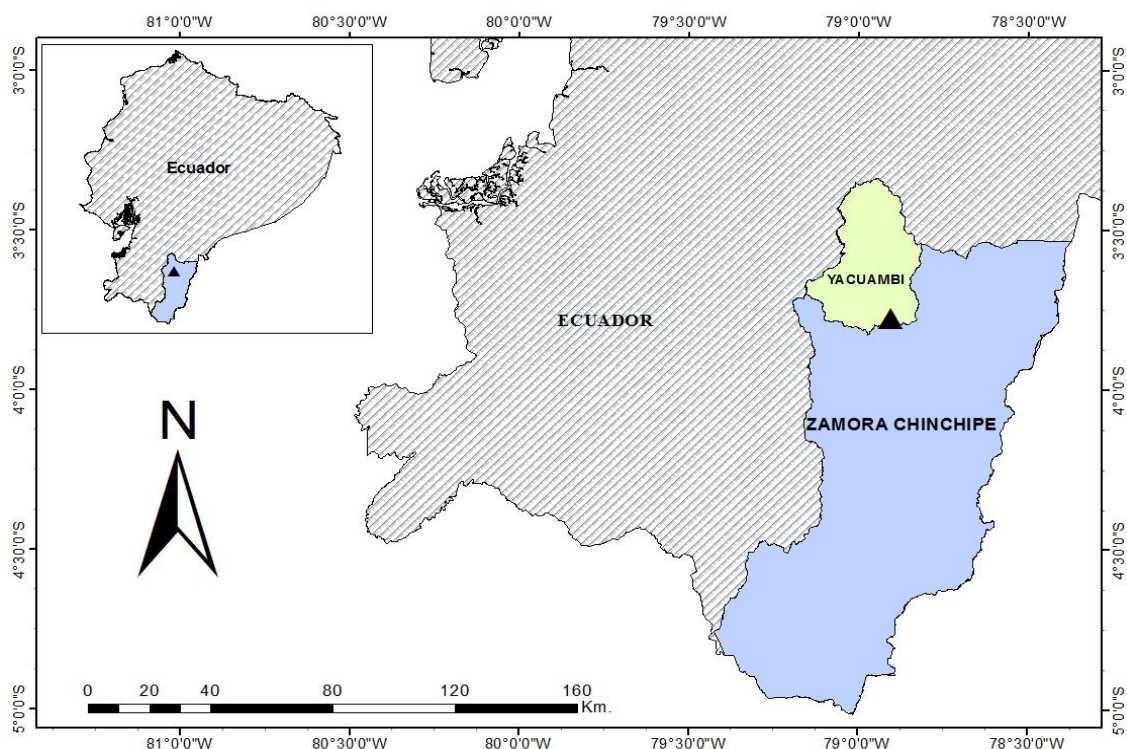


Figura 13. Área de recolección de la especie *Dacryodes peruviana*
Fuente: Benítez, 2016

La identificación taxonómica de la especie fue reconocida por el Ing. Nixon Cumbicus, docente investigador del Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja.

La especie fue recolectada en estado de fructificación, se realizó tres recolecciones distintas con un intervalo de 15 días entre una y otra recolección, una vez recolectada fue transportada hasta los laboratorios del Departamento de Química de la UTPL para su tratamiento post cosecha el cual consistió en seleccionar el material vegetal, eliminando ciertas partes deterioradas del fruto con el fin de evitar posibles contaminaciones y que estos interfieran en nuestros resultados (figura 14)



Figura 14. Muestra recolectada
(fruto *D. peruviana*)
Fuente: La autora.

2.1.2. Determinación de la humedad.

Se realizaron tres destilaciones de cada una de ellas, se guardó aproximadamente de 1 a 2 gramos de materia vegetal para determinar la humedad. La cual se realizó cortando pequeños pedazos del fruto obteniendo una muestra homogénea esto fue colocado en cápsulas de porcelana las cuales fueron llevadas a una lámpara ULTRA X por 45 minutos y posteriormente fueron colocadas en el desecador por 5 minutos se expuso nuevamente el material vegetal a la lámpara por 15 minutos con el fin de eliminar el agua presente en la especie, este proceso se realizó de 4 a 5 veces hasta que el peso se mantuviera constante (Chamba, 2015)

La determinación de la humedad se realizó por triplicado en cada una de las recolecciones con el fin de obtener resultados confiables (Correa, 2014)

Una vez terminado el procedimiento se procedió a realizar los cálculos respectivos para determinar la humedad de dicha especie (Ver Anexo I) (Chamba, 2015)

2.1.3. Extracción del aceite esencial.

Para hacer las destilaciones se realizaron tres recolecciones distintas, con un intervalo de 15 días entre una recolección y otra, se inició el 16 de marzo del 2015, la segunda recolección se realizó el 1 de abril del 2015 y la última recolección se realizó el 14 de abril del 2015. Se realizaron tres destilaciones distintas dándonos así nueve destilaciones.

Los aceites esenciales se obtuvieron a partir de las partes aéreas de la especie en este caso del fruto. La extracción se realizó por medio de destilación por arrastre de vapor que se llevó a cabo en un equipo de destilación (figura 15); en su parte interna tiene una placa perforada donde se colocó el material vegetal troceado, por debajo de esta placa se coloca agua que una vez que llegue al punto de ebullición el vapor circula el material vegetal y va arrastrando los componentes volátiles que forman parte del aceite esencial de la planta. El vapor formado pasa por un condensador donde es condensado y la mezcla de aceite y agua es recolectada en un florentino donde se separa por diferencias de densidades (Rosillo, 2012).

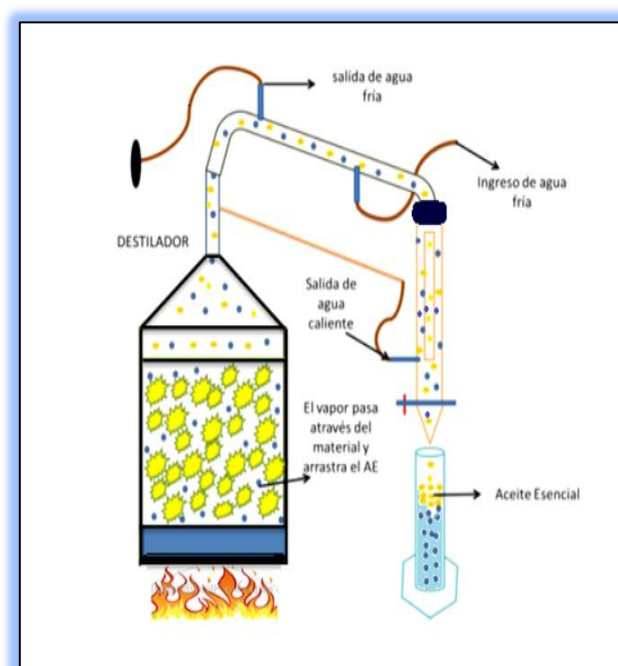


Figura 15. Proceso de destilación
Fuente: Arias, 2012

Una vez realizada la destilación se procedió a recoger el aceite esencial en una probeta para medir su volumen (figura 16) luego se almacenó el aceite en frascos ámbar herméticamente cerrados y debidamente etiquetados, con su respectivo código para cada aceite se hizo constar la inicial de la especie vegetal, el número de recolección, número de destilación y fecha de destilación como se muestra en la figura 17.

Finalmente los aceites se almacenaron en refrigeración a -4°C , con el fin de mantener el aceite en buenas condiciones y evitar la degradación del aceite por parte de la luz ya que sus componentes son muy volátiles (Merino, 2015)



Figura 16.Recolección del aceite esencial
Fuente: Correa, 2014.



Figura 17. Almacenamiento y etiquetado del aceite esencial
Fuente: La autora

2.1.3.1. Determinación del rendimiento.

El rendimiento se determinó de cada una de las destilaciones, relacionando el volumen de aceite obtenido con la cantidad de materia vegetal utilizada en la destilación; finalmente se reportó un valor medio de todas las destilaciones (Ver Anexo II) (Flores, 2015)

2.1.4. Determinación de las propiedades físicas

Se determinó la densidad relativa, el índice de refracción y la actividad óptica del aceite esencial del fruto de *Dacryodes Peruviana* (copal).

2.1.4.1. Densidad relativa.

La determinación de la densidad del aceite esencial se realizó según la norma AFNOR NF T75-111(ISO 279:1998) (Ver Anexo III), para lo cual se hizo uso del picnómetro de 1 ml, un termómetro y una balanza analítica (Correa, 2014).

Para determinar la densidad relativa del aceite esencial *D. peruviana*, se unió las tres muestras de aceites obtenidas en cada destilación para los valores obtenidos se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación.

2.1.4.2. Índice de refracción.

La determinación del índice de refracción se lo realizó según la norma AFNOR NF 75-112 25 (ISO 280:1998) (Ver Anexo IV) en el cual se utilizó un refractómetro ABBE, que es un dispositivo electrónico que mide la velocidad de una propagación de luz en el aceite esencial a una temperatura determinada de 20°C (Chamba, 2015)

Para lo cual se colocó una gota de aceite esencial y se procedió a la respectiva lectura. Se obtuvo un valor medio a partir de las muestras obtenidas de las mezclas de los tres aceites de cada recolección (Rosales, 2012)

2.1.4.3. Actividad óptica.

Para medir la actividad óptica se usó un polarímetro digital modelo Mrc- Automatic Polarimeter P810 (figura 18) y una celda de 1dm de longitud (figura 19), en el cual se midió la capacidad para desviar la luz polarizada del aceite esencial de la muestra

En el anexo V se muestra la fórmula para determinar la actividad óptica del aceite esencial. Se obtuvo un valor promedio a partir de las muestras obtenidas de la mezcla de los tres aceites por cada recolección.



Figura 18. Polarímetro digital
Fuente: La autora.



Figura 19. Celda del polarímetro
Fuente: La autora.

2.1.5. Determinación de la composición química del aceite esencial.

2.1.5.1. Cromatografía de gases

La composición química del aceite esencial del fruto *D. peruviana* se determinó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas y al detector de ionización de llama FID, dichas corridas cromatográficas se hicieron en dos columnas, una no polar DB-5ms y una polar HP-Innowax, con la finalidad de llevar a cabo el análisis cualitativo y cuantitativo respectivamente.

2.1.5.1.1. Preparación de la muestra.

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 traspasó a nuevos recipientes ámbar etiquetados. Cada muestra de aceite esencial para las inyecciones cromatográficas se prepararon en un vial de cromatografía en el cual se colocó 990 μL de diclorometano y 10 μL de aceite, obteniéndose una dilución al 1% de aceite esencial, se prepararon 9 disoluciones con los 9 aceites obtenidos de cada destilación.

De igual manera se realizó la inyección de hidrocarburos (C_{10} decano a C_{25} -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 (Flores, 2015).

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

La identificación de los componentes químicos del aceite esencial del fruto de *D. peruviana* por Cromatografía de Gases acoplado a la Espectrometría de Masas (CG-MS) se hizo mediante un Cromatógrafo de Gases Agilent y la obtención de los espectros

de cada compuesto individual. Las respectivas inyecciones se realizaron en las columnas capilares DB-5MS y HP-INNOWAX.

El equipo que se utilizó para hacer los respectivos análisis fue un Cromatógrafo de Gases Agilent serie 6890N, acoplada a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973 Inert; el equipo dispone de un sistema de datos “MSD-Chemstation D.01.00 SP1”, cuenta con un inyector automático Split/splitless serie 7683 y un detector de ionización de llama (FID) provisto de un generador de hidrogeno Gas Generator 9150 Packard” (Figura 20).



Figura 20. Cromatógrafo de gases
Fuente: Laboratorio de Química

El tamaño de las columnas fue de 30mx0, 25mm x 0,25µm. La columna no polar está recubierta internamente de 5%-Fenil-metilpolisiloxano y la columna polar tiene un recubrimiento interno de polietilenglicol.

La temperatura límite para la columna DB-5MS es de 325°C y para la columna HP-INNOWAX la temperatura es de 260°C.

2.1.5.1.3. Corrida cromatográfica en la columna no polar DB-5MS acoplado a espectrometría de masas.

Para realizar las respectivas corridas cromatográficas se usaron algunas medidas bajo los cuales se inyectaron las muestras del aceite esencial *D. peruviana*. También se realizó la inyección de una muestra de hidrocarburos de C₁₀ (decano) a C₂₅ (pentacosano), este conjunto de hidrocarburos comercialmente es conocido como TPH-RPM de CHEM SERVICE. Las condiciones utilizadas para realizar correctamente la cromatografía se describen en la figura 21 (Rosillo, 2012).

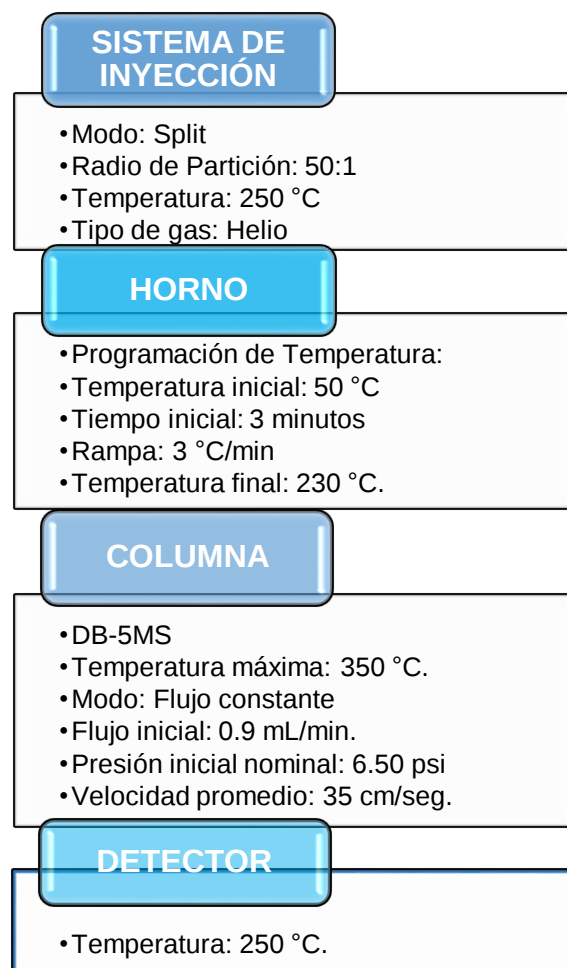


Figura 21. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna no polar (DB-5MS)

Fuente: La autora.

2.1.5.1.4. Corrida cromatográfica en la columna polar HP-INNOWAX acoplado a espectrometría de masas.

Al igual que en la columna no polar, en esta columna también se inyecta hidrocarburos. Las características bajo las cuales se inyecta la muestra en el cromatógrafo se describen en la figura 22 (Flores, 2015)

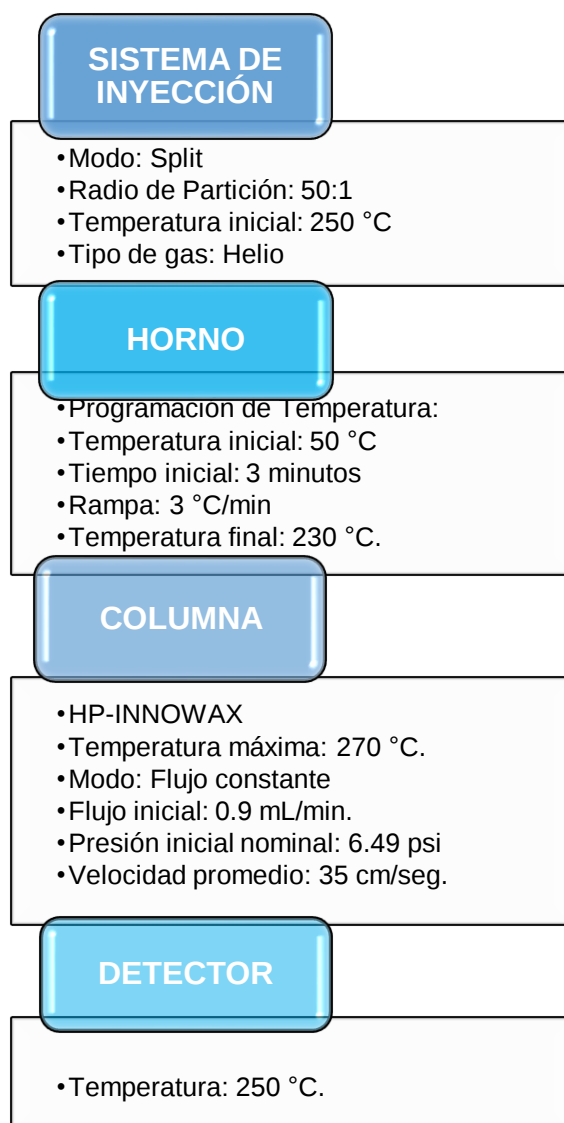


Figura 22. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna polar (HP-INNOWAX)
Fuente: La autora

2.1.5.1.5 Identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos químicos del aceite esencial D. peruviana, tanto en la columna polar como en la columna no polar.

Como resultado de la corrida cromatográfica, los compuestos se visualizaron en un cromatograma el cual se define como una representación gráfica de la señal producida por el detector en función del tiempo o del volumen de elución. La identificación de los componentes de la muestra se lleva a cabo a partir de la posición de los distintos picos respecto al eje del tiempo mientras que el área de cada uno, proporcional a la concentración del compuesto, permite el análisis cuantitativo.

Para que la identificación sea más precisa y confiable se procedió a integrar, lo cual nos permite tener una determinada cantidad de compuestos en cada una de las muestras a analizar, esto se realizó a través del sistema de integración propio del software del equipo para luego trabajar con los picos integrados.

Obtenido los cromatogramas se procedió a calcular mediante la ecuación 1 los índices de Kovats (IK) de los picos integrados, para ello se comparó el tiempo retención de los hidrocarburos con el tiempo de retención de los componentes del aceite esencial aplicando la siguiente formula:

$$IK = 100n + 100 * \frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \quad (1)$$

Dónde:

IK: Índice de retención de Kovats

n: Número de átomos de carbono en 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 de n-alcano que eluye después del compuesto analizado.

La identificación de los compuestos se llevó a cabo en base a los índices de Kovats (IK) determinados experimentalmente en las corridas cromatográficas tanto en la columna polar como no polar, valores que se compararon con los reportados por Adams (Adams, 2009), bases de datos electrónicas como Nist (National Institute of Standards and Technology) y en artículos de revistas como Flavour and Fragrance; de modo que la diferencia entre el IK calculado y el leído debe ser menor a 20 unidades. Además se tomó en cuenta parámetros como el número de CAS que presenta cada compuesto de tal modo que facilite la búsqueda y la identificación de los IK de los constituyentes químicos del aceite esencial de *Dacryodes Peruviana*.

2.1.5.1.6. Corrida cromatográfica en la columna no polar DB-5MS, acoplada al detector de ionización de llama (FID).

La metodología llevada a cabo con el detector de ionización de llama (FID) es igual a la metodología que se llevó a cabo en la cromatografía de gases acoplada al espectrómetro de masas. Las muestras fueron tratadas de igual manera antes de ser analizadas en el cromatógrafo; de igual manera también se inyectó hidrocarburos, previo

a la inyección de las muestras de aceite esencial del fruto *Dacryodes peruviana*. Lo que difiere son las condiciones en las que opero el cromatógrafo. Estas condiciones se exponen en la figura 23 (Chamba, 2015).

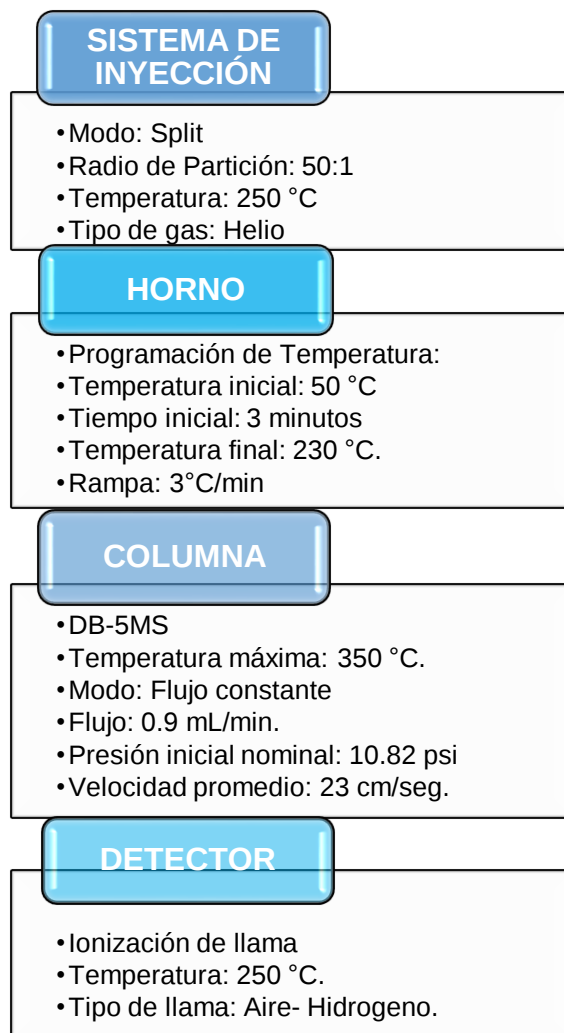


Figura 23. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna no polar (DB-5MS) acoplada a un detector de ionización de llama (FID)

Fuente: La autora

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

Las muestras inyectadas tuvieron el mismo tratamiento que en las cromatografías realizadas anteriormente y también se inyectó los hidrocarburos (C10decano a C25-pentacosano), de la misma forma que se llevó a cabo con la columna no polar.

Las condiciones operacionales utilizadas en el tratamiento de estas muestras son las siguientes (figura 24) (Flores, 2015)

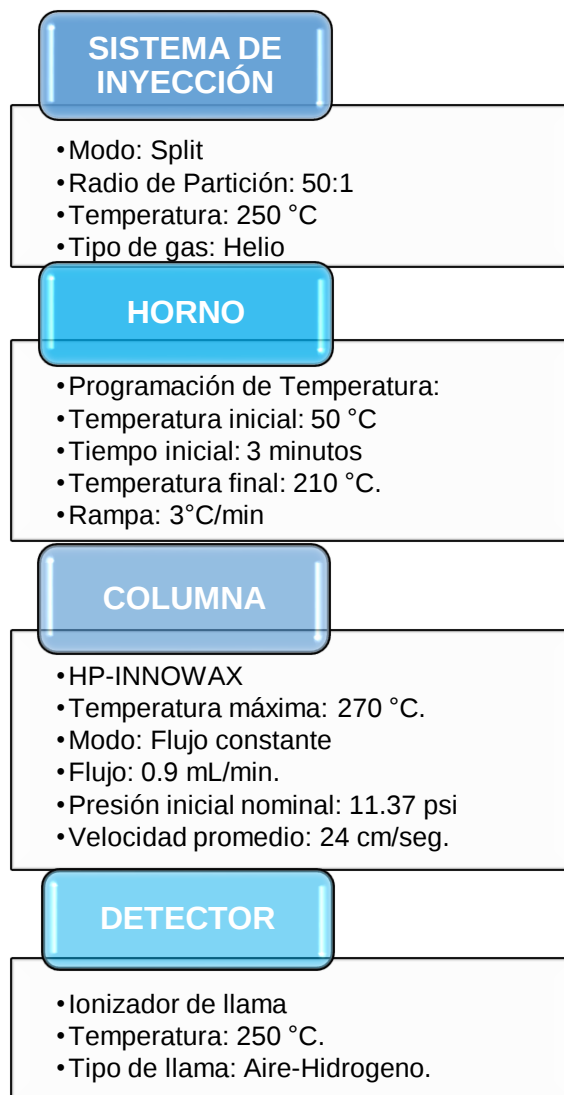


Figura 24. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna polar HP-INNOWAX acoplada a un detector de ionización de llama (FID).

Fuente: La autora.

2.1.5.1.7. Cuantificación de los compuestos identificados mediante cromatografía de gases acoplada al detector de ionización de llama (FID), en ambas columnas polar y no polar.

Posteriormente a la elución de los compuestos, se procedió a la cuantificación de los mismos. Los datos de hidrocarburos obtenidos en masas y en FID se utilizaron para calcular una ecuación de la recta con la cual se calcula los tiempos de retención de cada compuesto. Estos tiempos de retención calculados se comparan con los tiempos de

retención detectados de cada muestra; los tiempos de retención se van ajustando a los compuestos encontrados en cada columna, polar y no polar.

2.1.6. Determinación de la actividad biológica del aceite esencial de *Dacryodes peruviana*.

La actividad biológica fue evaluada mediante el método de microdilución en caldo frente a diferentes cepas bacterianas en esta prueba se calculó la Concentración mínima inhibitoria.

2.1.6.1 Microorganismos empleados.

Para evaluar la actividad biológica se utilizó diferentes tipos de cepas bacterianas patógenas, para determinar si el aceite del fruto de *Dacryodes peruviana*, puede ser utilizado como un antibacteriano de amplio espectro.

Los microorganismos utilizados son cepas bacterianas obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC) las cuales se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Microorganismos de prueba.

MICROORGANISMOS PATOGENOS	
Cepas bacterianas	
Bacterias Gram-negativas	Bacterias Gram- positivas
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 9997	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
<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. Prueba utilizada para evaluar la actividad antibacteriana.

La actividad antibacteriana del aceite esencial del fruto de *Dacryodes peruviana*, se determinó utilizando el método de microdilución en caldo reportando los resultados como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI); que se define como la concentración más baja que puede tener un antimicrobiano al inhibir el crecimiento de un microorganismo después de su incubación (Andrews, 2001).

2.1.6.2.1. Método microdilución en caldo.

El procedimiento de microdilución en caldo, es un método que posee la ventaja de que se utilizan volúmenes mínimos de la muestra a analizar. Se utiliza una placa que contiene 96 pocillos, en los cuales se realizan diluciones seriadas. Previamente se debe preparar las muestras a utilizar.

2.1.6.2.2. Preparación de la muestra del aceite esencial.

La muestra de aceite esencial que se va a emplear en este ensayo, debe estar diluida en un disolvente adecuado y a una concentración determinada. Con fines de bioprospección se emplea una solución de 100µL del aceite esencial en 400µL de DMSO (dimetilsulfóxido).

2.1.6.2.3. Preparación del cultivo bacteriano “Cultivo Overnight”.

Para la preparación del inóculo bacteriano, previamente se realizó los caldos de cultivo específicos para cada cepa bacteriana. Para la siembra en el caldo de cultivo específico, se utilizó 30µL 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 INCUBACION
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Caldo Tripticasa Soya	Temperatura: 37°C Tiempo: 14- 16 horas
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Caldo Tripticasa Soya	Temperatura: 37°C Tiempo: 14- 16 horas
<i>Proteus vulgaris</i>	Caldo Mueller Hinton	Temperatura: 37°C Tiempo: 14- 16 horas
<i>Escherichia coli</i>	Caldo Mueller Hinton	Temperatura: 37°C Tiempo: 14- 16 horas
<i>Salmonella typhimurium</i>	Caldo Nutritivo Oxoid	Temperatura: 37°C Tiempo: 14- 16 horas
<i>Enterococcus faecalis</i>	Caldo Infusión Cerebro-Corazón	Temperatura: 37°C Tiempo: 14- 16 horas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo Tripticasa Soya	Temperatura: 37°C Tiempo: 14- 16 horas

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 Mc Farland.

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 Tetraciclina de 1,953 $\mu\text{g/mL}$ para todas las bacterias utilizadas a excepción de *Enterococcus faecalis* para la cual se empleó Tetraciclina de 15,625 $\mu\text{g/mL}$ y *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus vulgaris* que se empleó Tetraciclina de 3,906 $\mu\text{g/mL}$). 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 $\mu\text{g/mL}$ (figura 25). El mismo procedimiento fue aplicado para el control positivo, negativo y de esterilidad.

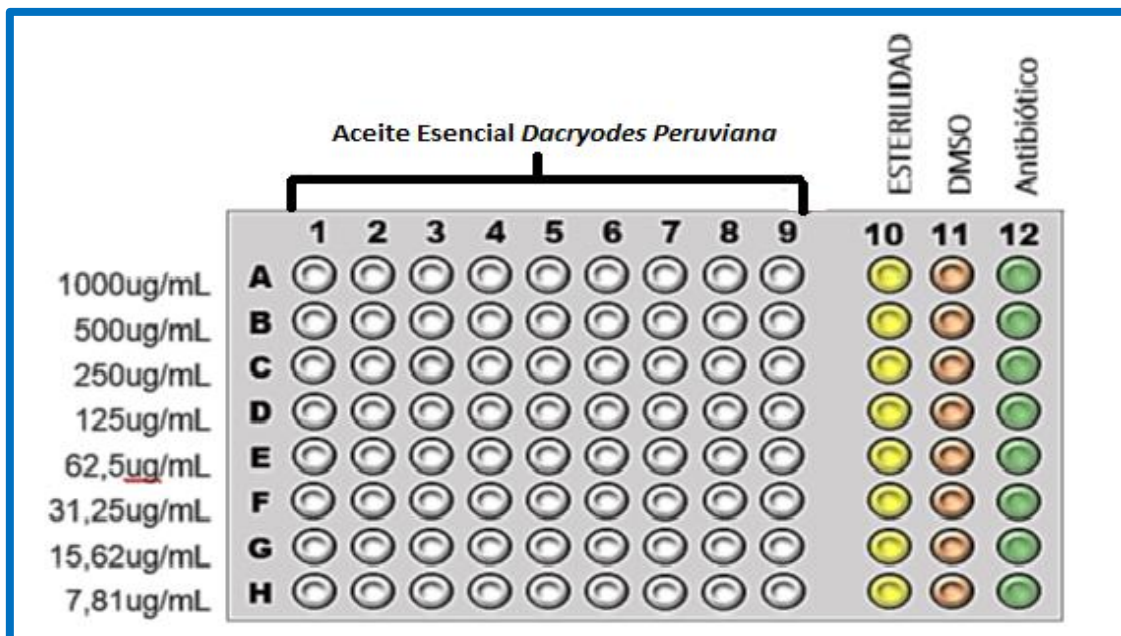


Figura 25. Modelo de Microplaca IC96 para bacterias con las concentraciones de aceite ($\mu\text{g/mL}$).
Fuente: La autora.

Finalmente ya preparada la placa de microdilución se inoculó con $100 \mu\text{L}$ 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 $200 \mu\text{L}$, ajustando la población bacteriana a $5 \times 10^5 \text{ ufc/mL}$. Al concluir la inoculación, las placas se sellaron con parafilm y fueron incubadas a 37°C de 18-24h.

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

Una vez retiradas las placas de microdilución de la incubadora, se observa cuidadosamente cada caja utilizando luz reflejada; se comienza examinando el control de esterilidad para descartar cualquier tipo de contaminación, ya que al existir contaminación la prueba no puede ser interpretada y debe ser repetida.

Por otro lado el control positivo nos indica que existió un crecimiento adecuado de las bacterias en la placa de microdilución. El crecimiento en este pocillo se nota como turbidez o un pellet de $> 2\text{mm}$.

Finalmente en el control negativo no se debe evidenciar ningún rastro de crecimiento, por el contrario debe estar claro y sin turbidez. Para determinar en qué punto se encuentra la concentración mínima inhibitoria de una muestra, es decir la concentración más baja a la que puede actuar el aceite como antimicrobiano, se debe leer el pocillo en

el cual se distinga turbidez del medio. Es un proceso manual no se requiere de la ayuda de ningún aparato óptico.

2.1.7. Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial del fruto de *Dacryodes peruviana*.

La evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial del fruto de *Dacryodes peruviana*, se obtuvo mediante dos métodos espectrofotométricos: 1). Capacidad de atrapamiento del catión – radical ABTS+ y 2). Radical DPPH.

Las mediciones se determinaron según la absorbancia que leía el equipo de cada muestra. Se utilizó un espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS Scanning 333907 figura 26. Las longitudes de onda empleadas en cada método fueron 734nm y 515nm respectivamente.

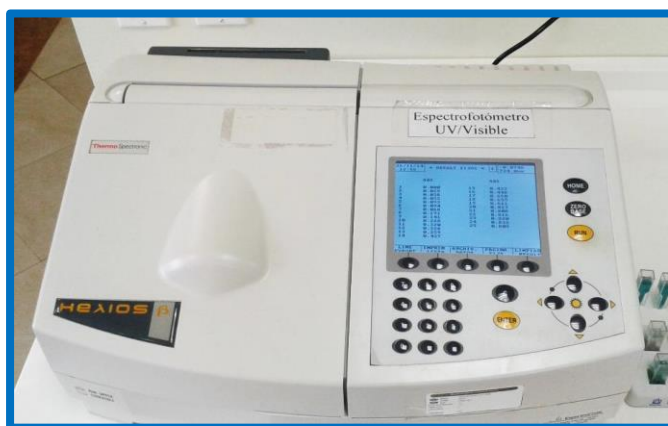


Figura 26. Espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS Scanning 333907
Fuente: La autora

2.1.7.1 Preparación de la muestra de aceite esencial del fruto de *D. peruviana*.

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 con 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 3, se explica cómo se realizó cada dilución, cabe destacar que el volumen final de cada dilución es de 5000μL.

Tabla 3. Volumen necesario para cada dilución de aceite.

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

Fuente. Investigación Experimental

2.1.7.2. Método capacidad de atrapamiento del catión – radical ABTS+.

2.1.7.2.1 Solución patrón y de trabajo de ABTS+.

Para realizar la solución patrón se mezcló dos reactivos diferentes. El primer reactivo fue el reactivo de ABTS+. (2,2 –azinobis-3-etil-benzotiazolina-6sulfónido), del cual se tomó una cantidad de 0,1015 g que se aforo a 25 mL con agua destilada. El segundo reactivo fue persulfato de potasio, del cual se pesó una cantidad de 0,01757 g de igual manera se aforo a 25mL con agua destilada. El primer y segundo reactivo se mezclan y se deja reposar por 12 horas protegidos de la luz

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 queremos conseguir se debe añadir más solución de trabajo, si por el contrario la lectura de la absorbancia es mayor a la que esperamos debemos añadir metanol puro. Previa a la lectura de absorbancia de la solución de trabajo debemos encerrar el equipo con metanol

2.1.7.2.2. Estándar Trolox para ABTS+.

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

Se pesó 25 mg de Trolox y se aforo en un balón de 100mL con metanol y 22mg de BHT el cual se aforo a 50mL de metanol. En la tabla 4, mencionamos cómo se realizó cada dilución, cabe destacar que el volumen final de cada una es de 5000µL

Tabla 4. Volumen necesario para cada dilución de Trolox y BHT.

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

Fuente. Investigación Experimental

Se tomó 150µL de cada dilución y 2850uL de la solución de trabajo dejándolo 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 respectivamente.

2.1.7.2.3. Lectura de muestras.

Para determinar si el aceite esencial del fruto de *Dacryodes peruviana* posee actividad antioxidante, se debe evaluar la 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 midieron con una absorbancia de 734nm (Figura 27).



Figura 27. Muestras del aceite esencial *D. peruviana* analizadas mediante el método ABTS+.

Fuente: Investigación Experimental.

2.1.7.3. Método radical DPPH.

2.1.7.3.1 Solución patrón y de trabajo para DPPH.

Para realizar la solución patrón se pesó 0,024 g de reactivo de DPPH y se aforó a 100mL con metanol la misma que fue almacenada a -4°C hasta su uso, de esta solución se tomó 10mL y se adicionó 45mL de metanol obteniéndose la solución de trabajo; se midió la absorbancia a una longitud de onda de 515nm ajustándose hasta obtener una lectura de $1,1 \pm 0,02$ (es decir los valores de la lectura de absorbancia pueden fluctuar desde 1,08 a 1,12). Si la lectura de la absorbancia es mayor se ajusta añadiendo metanol puro y si por el contrario es menor se ajusta añadiendo más solución patrón.

Previo a la lectura de la absorbancia de la solución de trabajo se encera el equipo con metanol, ya que este es el disolvente que estamos usando en todo el método

2.1.7.3.2. Estándar Trolox y BHT para DPPH.

Como ya se mencionó anteriormente Trolox fue utilizado 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 utilizamos las mismas diluciones a diferentes concentraciones del aceite esencial (ver tabla 3) y las diferentes concentraciones del estándar Trolox y BHT (ver tabla 4).

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 28).



Figura 28. Muestras del aceite esencial D. peruviana 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 (% Inh) empleando la ecuación 2.

$$\% Dis. = \left\{ \left(\frac{Abs.blanco - Abs.muestra}{Abs.blanco} \right) * 100 \right\} \quad (2)$$

Donde:

Abs. blanco: absorbancia de la solución de trabajo

Abs. muestra: absorbancia de la respectiva concentración

Con los valores obtenidos de % Inh, se calcula el valor de la concentración media inhibitoria (CI₅₀) de la muestra. El CI₅₀ de cada aceite se determinó realizando una gráfica de concentración (ppm) vs. Porcentaje de inhibición (% Inh) obteniendo así, una ecuación para la curva y calculando luego la concentración para la cual el porcentaje de inhibición es del 50%. Para obtener la ecuación necesaria para calcular CI₅₀, se utilizó el programa OriginPro versión 8E.

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.

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Determinación de humedad del fruto de *Dacryodes peruviana*

En la tabla 5 se presentan los valores obtenidos de la media de cada uno de los porcentajes de humedad de las tres destilaciones de cada recolección con su respectiva desviación estándar y coeficiente de variación.

Tabla 5. Porcentaje de humedad de la materia vegetal

Recolecciones	Humedad (%)	$\bar{X}$	σ
DP1	72,7	74,1	3,7
DP2	71,2		
DP3	78,3		

DP1: Primera recolección DP2: Segunda recolección DP3: Tercera recolección

$\bar{X}$: Media aritmética correspondiente a las diferentes repeticiones

σ : Desviación estándar

Fuente: Investigación Experimental

Elaboración: La autora

Haciendo una comparación entre los promedios de las tres recolecciones que se aprecian en la tabla 5 se puede observar que el porcentaje de humedad mayoritario corresponde para la tercera recolección (78,3 %) según Margulis & Sagan, (2012), nos señala que la variabilidad de estos resultados se puede atribuir a las condiciones climáticas, el suelo, el manejo de nutrientes y el desarrollo de la planta al momento de la recolección.

Es importante destacar que nuestra muestra se recolectó en distintos periodos de tiempo por ende los diversos cambios en el ambiente influyeron en la humedad de la planta, considerando que los vientos fuertes y lluvias esporádicas hicieron que exista variación de humedad en las diferentes recolecciones.

3.2. Determinación de rendimiento.

En la tabla 6 se presentan los valores obtenidos de la media de cada uno de los porcentajes del rendimiento obtenido de las tres destilaciones de cada recolección con su respectiva desviación estándar y coeficiente de variación.

Tabla 6. Rendimiento en % v/p del aceite esencial del fruto *Dacryodes peruviana*.

Recolecciones	Rendimiento %	$\bar{X}$	σ
DP1	4,8	4,5	0,3
DP2	4,6		
DP3	4,2		
DP1: Primera recolección DP2: Segunda recolección DP3: Tercera recolección			
X̄: Media aritmética correspondiente a las diferentes repeticiones			
σ: Desviación estándar			

Fuente: Investigación Experimental

Elaboración: La autora.

El rendimiento de los aceites esenciales fue calculado en relación al volumen/peso; el promedio del rendimiento mayoritario que se obtuvo fue de la primera recolección dándonos un porcentaje de (4,8%) y el menor fue el de la tercera recolección de (4,2%), la cantidad de material que se utilizó en la primera destilación fue 2,359 Kg, obteniéndose aproximadamente un volumen de aceite esencial de 115 mL. Mientras que en la tercera recolección se utilizó 3,099 Kg, obteniendo un volumen de aceite esencial de 98 mL.

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 alto. De acuerdo a esta clasificación el porcentaje de rendimiento obtenido es bastante alto siendo de 21mL/kg.

Según Agnihotri et al.(2012), nos menciona que el tipo de planta, la porción empleada, el estado fisiológico y el procedimiento de la destilación u obtención del material inicial son elementos importantes a considerar en la variabilidad del rendimiento de la destilación por arrastre de vapor.

3.3. Determinación de las propiedades físicas del aceite esencial.

Entre las características físicas determinadas para el aceite esencial del fruto de *D. peruviana* tenemos: densidad, índice de refracción y actividad óptica.

3.3.1. Densidad del aceite esencial.

En la tabla 7 se detalla el valor promedio de la densidad obtenida en las tres recolecciones.

Tabla 7. Densidad relativa del aceite esencial *D. peruviana*

Recolecciones	Densidad (g/cm3)	$\bar{X}$	σ
DP1	0,8429	0,8456	0,0023
DP2	0,8472		
DP3	0,8466		
DP1: Primera recolección DP2: Segunda recolección DP3: Tercera recolección			
$\bar{X}$: Media aritmética correspondiente a las diferentes repeticiones			
σ : Desviación estándar			

Fuente: Investigación Experimental

Elaboración: La autora

Como se puede observar en la tabla 7 la densidad promedio del aceite esencial obtenida en las tres recolecciones fue de 0,846g/cm³.

La densidad de los aceites varía entre 0.84 y 1.18 g/cm³ dependiendo de la especie y del lugar de origen, según Costa-Batllo, (2003), el valor promedio obtenido en el aceite en estudio es comparable con la literatura, la densidad del aceite esencial se encuentra dentro del valor establecido siendo de 0,846g/cm³.

El resultado de densidad del presente trabajo nos indica calidad y pureza del aceite extraído, siendo influenciado probablemente por la naturaleza de la planta y condiciones climáticas del área geográfica de procedencia (Albaladejo, 1999).

3.3.2. Índice de refracción del aceite esencial.

En la tabla 8 se muestra el valor promedio del índice de refracción obtenido en las tres recolecciones.

Tabla 8. Índice de refracción del aceite esencial *D. peruviana*

Recolecciones	Índice de refracción	$\bar{X}$	σ
DP1	1,4753	1,4751	0,0002
DP2	1,4750		
DP3	1,4749		
DP1: Primera recolección DP2: Segunda recolección DP3: Tercera recolección			
X̄: Media aritmética correspondiente a las diferentes repeticiones			
σ: Desviación estándar			

Fuente: Investigación Experimental
Elaboración: La autora.

El índice de refracción registrado para aceite esencial de frutos se encuentra entre los valores de 1,474 - 1,478 (Viturro et al., 2010). Como se puede apreciar en la tabla 8, el promedio del índice de refracción del fruto de *D. peruviana* se encuentra los valores de referencia. Esta propiedad física nos indica la pureza y calidad de los aceites tanto a nivel de laboratorio como a nivel industrial (Pérez, 2006).

3.3.3. Actividad óptica específica del aceite esencial.

En la tabla 9 se detalla el valor promedio de la actividad óptica obtenida en las tres recolecciones.

Tabla 9. Actividad óptica del aceite esencial *D. peruviana*

Recolecciones	Actividad Óptica	$\bar{X}$	σ
DP1	12,1562°	12,1543°	0,0020
DP2	12,1545°		
DP3	12,1523°		
DP1: Primera recolección DP2: Segunda recolección DP3: Tercera recolección			
X̄: Media aritmética correspondiente a las diferentes repeticiones			
σ: Desviación estándar			

Fuente: Investigación Experimental
Elaboración: La autora.

Como se puede apreciar en la tabla 9, el valor promedio de la actividad óptica es de $+12,154^\circ$ cercano al valor de referencia obtenido de la especie *Bursera graveolans* $+11,023^\circ$ (Manzano, 2007), dicha actividad es dextrógira porque rota la luz polarizada en el sentido de las agujas del reloj, es decir es una sustancia ópticamente activa y no contiene algún tipo de adulteración en el aceite esencial (Weast, 2010).

3.4. Compuestos químicos del esencial *D. peruviana*.

3.4.1. Análisis cualitativo y cuantitativo

En la figura 29 y 30, se puede observar los perfiles cromatográficos del aceite esencial del fruto de *Dacryodes peruviana* obtenidos en la columna no polar (DB-5ms) y en la columna polar (HP-Innowax) mediante la técnica de CG-EM.

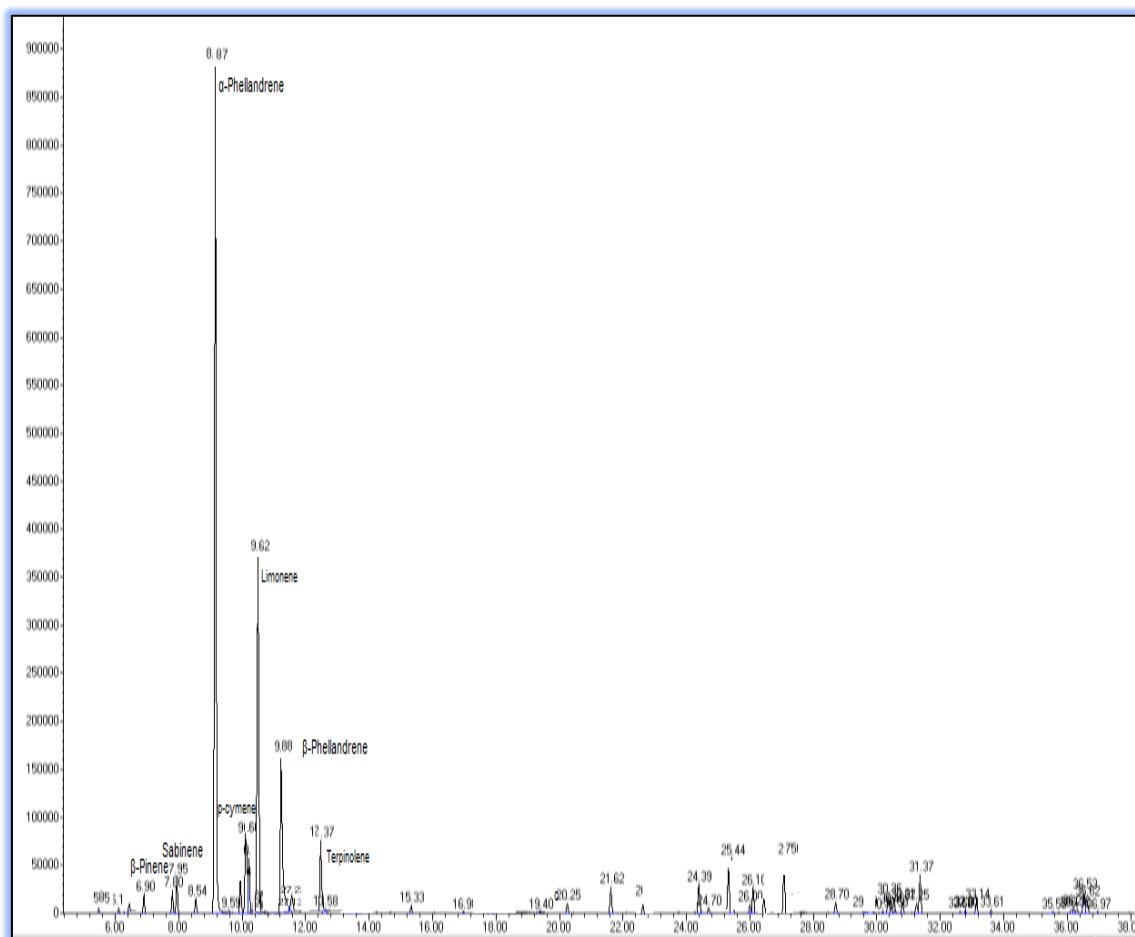


Figura 29. Perfil cromatográfico del aceite esencial *D. peruviana* en la columna no polar (DB-5ms)

Fuente: La autora

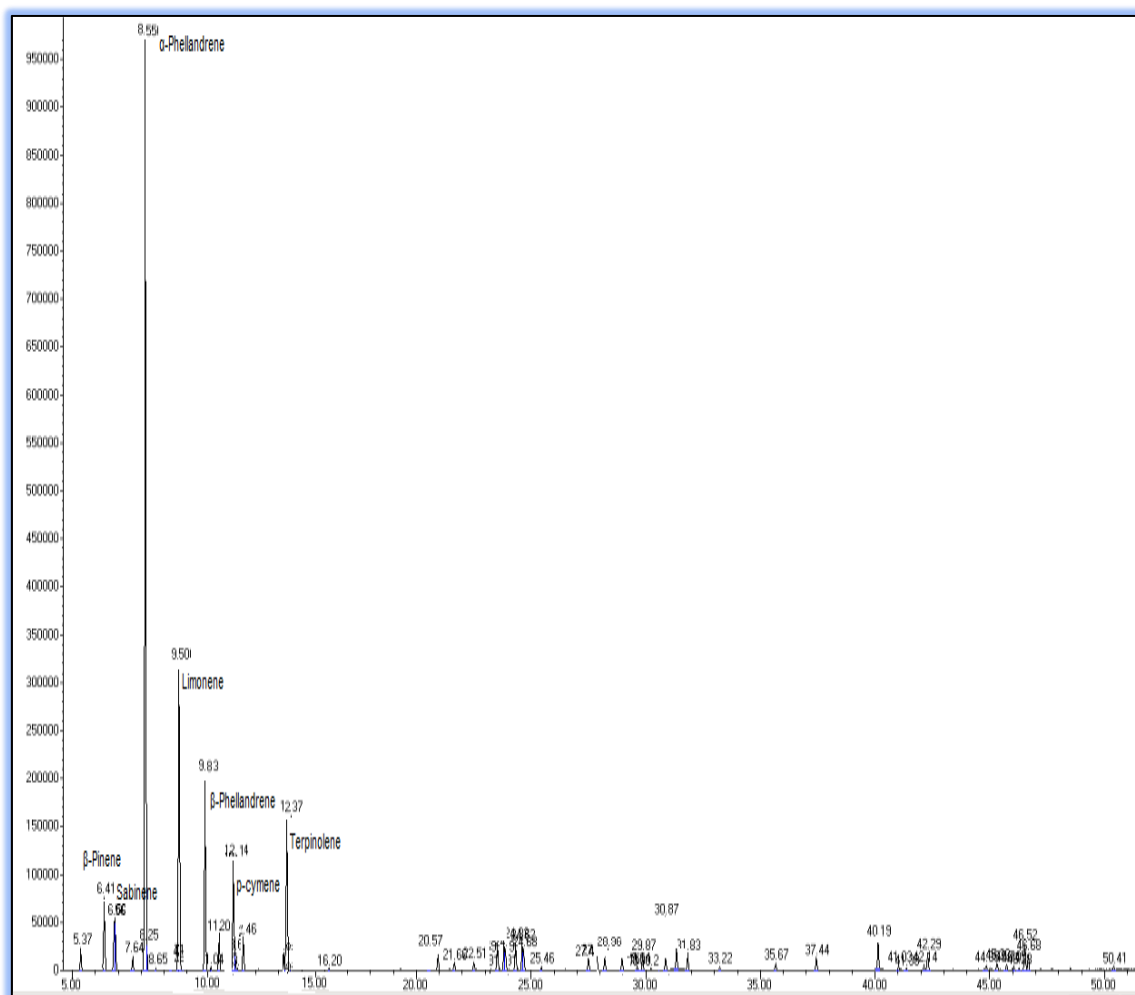


Figura 30. Perfil cromatográfico del aceite esencial *D, peruviana* en la columna polar HP-Innowax
Fuente: La autora.

En la tabla 10, se detalla la composición química del aceite esencial del fruto de *D. peruviana* en las columnas DB-5ms y HP-Innowax; los mismos que están descritos de acuerdo al orden de elución en la columna DB-5ms, resaltando los compuestos con mayores áreas, se indican los índices de Kóvats tanto experimentales como los reportados en la literatura, el porcentaje promedio relativo y desviación estándar para cada compuesto correspondiente a cada recolección.

Tabla 10. Composición química del fruto *D. peruviana*

Nº	COMPUESTOS	DB5-ms							HP-Innowax						
		<i>IK</i> ^{cal}	<i>IK</i> ^{ref}	% de Cantidad Relativa ^a			$\bar{X}$	σ	<i>IK</i> ^{cal}	<i>IK</i> ^{ref}	% de Cantidad Relativa ^a			$\bar{X}$	σ
				DP1	DP2	DP3					DP1	DP2	DP3		
1	Tricyclene	930	926 ^b		0,08	0,03	0,05	0,03							
2	α -Thujene	934	930 ^b	3,21	1,31	1,18	1,90	1,14							
3	Camphene	952	954 ^b	0,08	0,14	0,16	0,13	0,04	1069	1066 ^e	0,1	0,19	0,19	0,16	0,05
4	Sabinene	972	975 ^b	3,04	0,47	0,80	1,44	1,40	1116	1129 ^d	4,15	0,95	1,17	2,09	1,79
5	β -Pinene	975	974 ^b	1,62	2,68	3,42	2,57	0,91	1103	1118 ^c	2,02	4,04	4,51	3,52	1,32
6	Myrcene	989	990 ^b	0,85	0,50	0,84	0,73	0,20							
7	β - Phellandrene	998	1025 ^b	9,13	6,80	8,88	8,27	1,28	1212	1218 ^k	4,68	9,47	13,25	9,14	4,29
8	α -Phellandrene	1003	1002 ^b	26,01	72,49	52,46	50,32	23,32	1163	1165 ^f	29,94	71,03	53,83	51,60	20,63
9	α -Terpinene	1013	1017 ^b	0,26	0,37	0,32	0,32	0,05	1179	1182 ^m	0,36	0,53	0,45	0,45	0,09
10	P- Cymene	1021	1020 ^b	1,12	2,79	5,26	3,06	2,08	1270	1280 ^g	1,99	4,75	7,37	4,70	2,69
11	Limonene	1026	1029 ^b	36,28	10,30	22,51	23,03	13,00	1196	1202 ^f	34,06	3,88	12,18	16,71	15,59
12	3- δ Carene	1035	1011 ^b	0,29	0,16	0,08	0,18	0,11							
13	γ -Terpinene	1054	1054 ^b	0,51	0,07	0,12	0,23	0,24	1242	1244 ^f	0,68	0,06	0,18	0,31	0,33
14	Terpinolene	1081	1088 ^b	15,54	0,07	0,08	5,23	8,93	1286	1290 ^f	19,10	0,17	0,16	6,48	10,93
15	Mentha-2,4(8)-diene<p>	1102	1085 ^b	0,02											
16	Camphor	1141	1146 ^b	0,05	0,02	0,03	0,03	0,02	1503	1532 ^l	0,02	0,03		0,02	0,01
17	Terpinen-4-ol	1177	1177 ^b	0,09	0,01	0,11	0,07	0,05	1599	1598 ^c	0,18	0,03	0,16	0,13	0,08
18	Cymen-8-ol<p>	1191	1179 ^b	0,06					1851	1864 ^j	0,20				
19	Benzenopropanal	1202	1163 ^b		0,76	1,20	0,98	0,31							
20	p- Menthane	1250	1249 ^b		0,42	0,92	0,67	0,35							
21	Ascaridole	1262	1234 ^b		0,11	0,13	0,12	0,02							
22	Dihydro carveol acetate	1325	1306 ^b	0,01											
23	δ -Elemene	1328	1335 ^b	0,14	0,03	0,02	0,06	0,07	1461	1468 ^m	0,19				
24	α -Copaene	1366	1376 ^b	0,02	0,05	0,08	0,05	0,03	1478	1497 ^l	0,08	0,34	0,52	0,31	0,22
25	Caryophyllene	1408	1417 ^b	0,04	0,15	0,21	0,13	0,09	1581	1592 ^f	0,07	0,30	0,24	0,20	0,12

26	Humulene <α->	1444	1452 ^b		0,03	0,02	0,03	0,00	1653	1660 ^m		0,04	0,13	0,08	0,07	
27	Germacrene-D	1470	1484 ^b	0,40	0,03	0,03	0,15	0,21	1692	1693 ^m	0,60	0,07	0,08	0,25	0,30	
28	Valencene	1478	1496 ^b	0,01												
29	δ-Amorphene	1509	1511 ^b	0,01	0,01	0,03	0,02	0,01								
30	Curcumene <β->	1546	1514 ^b	0,01		0,14	0,07	0,09	1546	1514 ^h	0,01		0,14	0,07	0,09	
31	Nerolidol	1561	1531 ^b			0,04			2041	2050 ^k			0,12			
32	Caryophyllene oxide	1569	1582 ^b			0,03										
33	cis-β-Ocimene								1235	1239 ^f	0,13	0,22	0,20	0,19	0,05	
34	trans-β-Ocimene								1250	1254 ^h	0,07	0,06	0,04	0,06	0,01	
35	Allocimene								1370	1382 ^h	0,05	0,09	0,09	0,07	0,02	
36	p-Cymenene								1433	1414 ⁱ	0,05					
37	β-Cubebene								1559	1544 ^e	0,07					
38	γ-Elemene								1628	1650 ^f	0,05		0,38	0,22	0,23	
39	β-Gurjunene								1648	1610 ^j	0,01					
40	α- Terpineol								1695	1706 ^g			0,10			
41	Verbenone								1703	1725 ^k		0,07	0,11	0,09	0,03	
42	δ-Cadinene								1746	1748 ^h	0,05	0,15	0,20	0,13	0,08	
43	trans- Carveol								1822	1832 ^g		0,06	0,20	0,13	0,10	
44	Thymol								2221	2198 ^k	0,02	0,05	0,13	0,07	0,06	
*TOTAL IDENTIFICADO								98,37		*TOTAL IDENTIFICADO						96,25

a= % promedio calculados en base al % de área de los picos reportados en la columna DB5-MS y HP-INNOWAX respectivamente (ver Anexo VI)

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

DP1= Aceites de la primera recolección; **DP2**= Aceites de la segunda recolección; **DP3**= Aceites de la tercera recolección

DP1, DP2 Y DP3: Promedios calculados de las tres recolecciones en base a su porcentaje de área Ver anexo (VII)

$\bar{X}$ = Promedio

σ = Desviación estándar

IK^{cal} = Índice de Kóvats calculado

IK^{ref} = Índice de Kovats reportado en la literatura: : ^bref.1 ; ^cref. 2 ; ^dref.3; ^eref. 4; ^fref. 5; ^gref. 6; ^href. 7; ⁱref. 8; ^jref. 9; ^kref.10; ^lref. 11; ^mref. 12. ver anexo(V)

Elaboración: La autora

En la figura 31, se puede apreciar los porcentajes de los siete compuestos mayoritarios del aceite esencial del fruto de *Dacryodes peruviana* en la columna DB-5ms, entre los cuales tenemos: α -Phellandrene (50,32%), Limonene (23,03%), β - Phellandrene (8,27%), Terpinolene (5,23%), p-Cymene (3,06%), β - Pinene (2,57%) y Sabinene (1,44%).

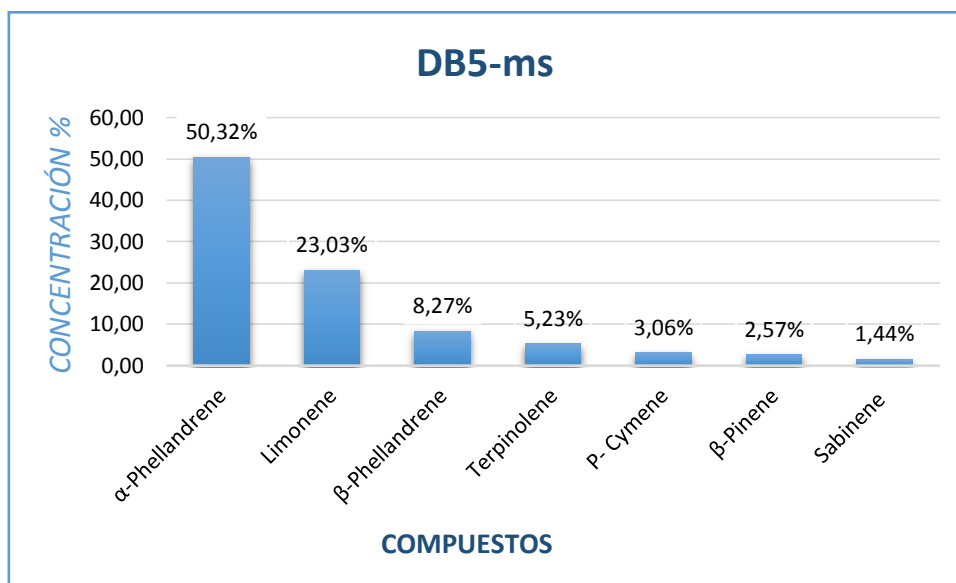


Figura 31. Compuestos mayoritarios en la columna no polar (DB5-ms)

Elaboración: La autora.

Los porcentajes de los siete compuestos mayoritarios del aceite esencial del fruto de *Dacryodes peruviana* en la columna HP-Innowax se muestran en la figura 32, entre los cuales tenemos: α -Phellandrene (51,60%), Limonene (16,71%), β -Phellandrene (9,14%), Terpinolene (6,48%), p-Cymene (4,70%), β - Pinene (3,52%), Sabinene (2,09%).

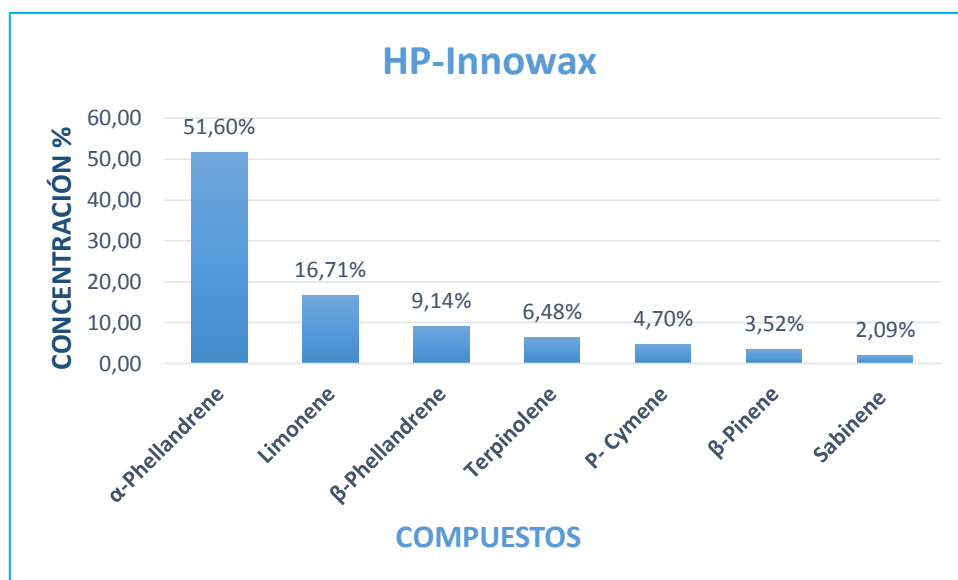


Figura 32. Compuestos mayoritarios en la columna polar (HP-Innowax).
Elaboración: La autora

El análisis cuantitativo se realizó mediante la comparación del porcentaje de cantidad relativa de los picos detectados en el detector de ionización de llama (FID) con el porcentaje de cantidad relativa de los picos de los compuestos identificados en Espectrofotometría de masas (EM) tanto en la columna polar y no polar.

En la tabla 11, se observa los resultados en la cual se presentan los porcentajes de cantidad relativa por cada recolección, el promedio y la desviación estándar.

Mediante el análisis cualitativo y cuantitativo se confirmó la presencia de los compuestos identificados en el aceite esencial del fruto de *D. peruviana*.

Tabla 11. Comparación de la cantidad relativa (%) de los compuestos químicos del aceite esencial por CG-MS y CG-FID

Nº	COMPUESTOS	DB5-ms										HP-Innowax									
		% de Cantidad Relativa						$\bar{X}$		σ		% de Cantidad Relativa						$\bar{X}$		σ	
		DP1		DP2		DP3		$\bar{X}$		σ		DP1		DP2		DP3		$\bar{X}$		σ	
		MS	FID	MS	FID	MS	FID					MS	FID	MS	FID	MS	FID				
1	Tricyclene			0,08	0,08	0,03	0,02	0,05	0,05	0,03	0,04										
2	α -Thujene	3,21	3,14	1,31	1,30	1,18	1,21	1,90	1,88	1,14	1,09										
3	Camphene	0,08	0,08	0,14	0,14	0,16	0,17	0,13	0,13	0,04	0,04	0,1	0,10	0,19	0,17	0,19	0,20	0,16	0,16	0,05	0,05
4	Sabinene	3,04	3,09	0,47	0,49	0,80	0,81	1,44	1,46	1,40	1,42	4,15	3,89	0,95	0,92	1,17	1,33	2,09	2,05	1,79	1,61
5	β -Pinene	1,62	1,78	2,68	2,67	3,42	3,69	2,57	2,71	0,91	0,95	2,02	2,66	4,04	4,00	4,51	4,71	3,52	3,79	1,32	1,04
6	Myrcene	0,85	0,89	0,50	0,47	0,84	0,91	0,73	0,76	0,20	0,25										
7	β -Phellandrene	9,13	9,05	6,80	6,83	8,88	9,30	8,27	8,39	1,28	1,36	4,68	4,31	9,47	9,09	13,25	13,09	9,14	8,83	4,29	4,40
8	α -Phellandrene	26,01	25,27	72,49	72,56	52,46	52,81	50,32	50,21	23,32	23,76	29,94	27,14	71,03	69,91	53,83	51,22	51,60	49,42	20,63	21,44
9	α -Terpinene	0,26	0,30	0,37	0,33	0,32	0,33	0,32	0,32	0,05	0,02	0,36	0,38	0,53	0,56	0,45	0,46	0,45	0,47	0,09	0,09
10	P- Cymene	1,12	1,05	2,79	2,45	5,26	5,33	3,06	2,94	2,08	2,18	1,99	1,99	4,75	4,47	7,37	6,02	4,70	4,16	2,69	2,03
11	Limonene	36,28	37,09	10,30	10,39	22,51	21,85	23,03	23,11	13,00	13,39	34,06	33,24	3,88	4,05	12,18	12,38	16,71	16,56	15,59	15,04
12	3- δ Carene	0,29	0,28	0,16	0,18	0,08	0,10	0,18	0,19	0,11	0,09										
13	γ -Terpinene	0,51	0,35	0,07	0,07	0,12	0,10	0,23	0,17	0,24	0,16	0,68	0,68	0,06	0,06	0,18	0,13	0,31	0,29	0,33	0,34
14	Terpinolene	15,54	15,09	0,07	0,07	0,08	0,09	5,23	5,08	8,93	8,67	19,10	19,17	0,17	0,17	0,16	0,14	6,48	6,49	10,93	10,98
15	Mentha-2,4(8)-diene<p>	0,02	0,03																		
16	Camphor	0,05	0,05	0,02	0,02	0,03	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03			0,02	0,02	0,01	0,01
17	Terpinen-4-ol	0,09	0,09	0,01	0,01	0,11	0,11	0,07	0,07	0,05	0,05	0,18	0,14	0,03	0,03	0,16	0,16	0,13	0,11	0,08	0,07
18	Cymen-8-ol<p>	0,06	0,07									0,20	0,19								
19	Benzenopropanal			0,76	0,75	1,20	0,96	0,98	0,86	0,31	0,15										
20	p- Menthane			0,42	0,42	0,92	0,69	0,67	0,55	0,35	0,19										
21	Ascaridole			0,11	0,10	0,13	0,13	0,12	0,12	0,02	0,03										
22	Dihydro carveol acetate	0,01	0,01																		
23	δ -Elemene	0,14	0,09	0,03	0,03	0,02	0,02	0,06	0,05	0,07	0,04	0,19	0,20								
24	α -Copaene	0,02	0,02	0,05	0,05	0,08	0,08	0,05	0,05	0,03	0,03	0,08	0,08	0,34	0,30	0,52	0,45	0,31	0,28	0,22	0,19
25	Caryophyllene	0,04	0,03	0,15	0,15	0,21	0,21	0,13	0,13	0,09	0,09	0,07	0,06	0,30	0,32	0,24	0,24	0,20	0,21	0,12	0,13

26	Humulene <α->			0,03	0,03	0,02	0,02	0,03	0,03	0,00	0,01			0,04	0,16	0,13	0,13	0,08	0,14	0,07	0,02
27	Germacrene-D	0,40	0,40	0,03	0,03	0,03	0,03	0,15	0,15	0,21	0,21	0,60	0,58	0,07	0,07	0,08	0,08	0,25	0,24	0,30	0,29
28	Valencene	0,01	0,01																		
29	δ-Amorphene	0,01	0,17	0,01	0,01	0,03	0,03	0,02	0,07	0,01	0,09										
30	Curcumene <β->	0,01	0,01			0,14	0,15	0,07	0,08	0,09	0,10										
31	Nerolidol					0,04	0,03									0,12	0,11				
32	Caryophyllene oxide					0,03	0,02														
33	cis-β-Ocimene											0,13	0,13	0,22	0,24	0,20	0,20	0,19	0,19	0,05	0,05
34	trans-β-Ocimene											0,07	0,07	0,06	0,06	0,04	0,14	0,06	0,09	0,01	0,04
35	Allocimene											0,05	0,04	0,09	0,09	0,09	0,09	0,07	0,07	0,02	0,03
36	p-Cymenene											0,05	0,05								
37	β-Cubebene											0,07	0,06								
38	γ-Elemene											0,05	0,05			0,38	0,38	0,22	0,22	0,23	0,24
39	β-Gurjunene											0,01	0,01								
40	α- Terpineol															0,10	0,11				
41	Verbenone													0,07	0,06	0,11	0,10	0,09	0,08	0,03	0,03
42	δ-Cadinene											0,05	0,05	0,15	0,22	0,20	0,21	0,13	0,16	0,08	0,10
43	trans- Carveol													0,06	0,10	0,20	0,20	0,13	0,15	0,10	0,07
44	Thymol											0,02	0,02	0,05	0,04	0,13	0,13	0,07	0,06	0,06	0,06
*TOTAL IDENTIFICADO								98,37	97,84					**TOTAL IDENTIFICADO				96,25	94,09		

Compuestos según el orden de elución de la columna DB-5ms

* = Sumatoria del porcentaje relativo de los compuestos identificados en la columna DB-5MS- Masas y DB-5MS-Fid

** = Sumatoria del porcentaje relativo de los compuestos identificados en la columna HP-Innowax- Masas y HP-Innowax-Fid

DP1: Aceites de la primera recolección **DP2:** Aceites de la segunda recolección **DP3:** Aceites de la tercera recolección

MS: Cromatografía de Gases acoplada al Espectrometría de Masas

FID: Cromatografía de Gases acoplada al Detector de Ionización de llama

$\bar{X}$: Promedio

σ : Desviación estándar

Elaboración: La autora

La determinación química realizada del aceite esencial del fruto de *Dacryodes peruviana* permitió identificar 44 compuestos químicos; en la columna no polar (DB-5ms) se identificaron 32 compuestos con un porcentaje de identificación de 98,37% y en la columna polar (Hp-Innowax) se identificaron 31 compuestos con un porcentaje de identificación de 96,25%

No existen estudios previos de los compuestos químicos de la especie *Dacryodes peruviana*, así como tampoco del género, sin embargo en la literatura se encuentran investigaciones de la composición química de la familia a la que pertenece (Burseraceae). Según Salas et al. (2006) la familia *Bursera graveolans* identificó 8 compuestos mayoritarios a partir de sus frutos los cuales fueron: α -Thujene (0,26%), α -pinene (0,99%), Sabinene (0,29%), p-Cymene (1,51%), α -Phellandrene (35,55%), Limonene (52,82%), Menthofuran (5,32%), Germacrene D (1,28%). En cuanto a los compuestos mayoritarios realizados en el presente estudio tenemos: α -Phellandrene (50,32%), Limonene (23,03%), β -Phellandrene (8,27%), Terpinolene (5,23%), p-Cymene (3,06%), β -Pinene (2,57%) y Sabinene (1,44%).

Las diferencias relacionadas a la composición del aceite, pueden explicarse por variaciones en las condiciones ecológicas (clima, tipo de suelo, estación del año, lugar geográfico) en que se desarrolla la planta y condiciones de extracción (método de extracción, tiempo, condiciones de la materia prima) que pueden producir en el aceite cambios cualitativos y cuantitativos (Sánchez et al., 2009).

Uno de los compuestos mayoritarios que se presentó en la composición química del aceite esencial del fruto *D. peruviana* fue el α -Phellandrene (50,32%), es un monoterpeno cíclico de isómeros con doble enlace. Es empleado como aromatizante por su agradable aroma, se le atribuye virtudes fungicidas.

3.5. Actividad biológica del aceite esencial del fruto *Dacryodes peruviana*.

Para determinar la actividad antimicrobiana se emplearon ciertos métodos que permitieron medir la susceptibilidad in-vitro de microorganismo frente a ciertos agentes antimicrobianos determinando la fuerza de la sustancia, la susceptibilidad de microorganismos a concentraciones conocidas de una droga de origen vegetal y la concentración de la droga en el organismo humano.

3.5.1 Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana.

En la tabla 12 se observa los resultados obtenidos de la CMI de los aceites obtenidos en cada destilación frente a 5 cepas bacterianas gram-negativas y 2 cepas bacterianas gram-positivas.

Tabla 12. CMI antibacteriana (mg/mL) del aceite esencial frente a 7 cepas bacterianas

GRAM-NEGATIVAS						GRAM-POSITIVAS	
Aceite Esencial	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427 mg/mL	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853 mg/mL	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 mg/mL	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 9997 mg/mL	<i>Salmonella typhimurium</i> (LT2) mg/mL	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 mg/mL	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 mg/mL
DP11	2,5	5	2,5	2,5	10	0,625	2,5
DP12	10	–	10	10	–	10	2,5
DP13	5	10	2,5	2,5	10	1,25	2,5
DP21	10	–	5	5	–	1,25	–
DP22	–	–	–	–	–	10	–
DP23	5	10	5	5	–	1,25	5
DP31	–	–	10	–	–	2,5	5
DP32	–	–	5	10	–	1,25	5
DP33	5	10	5	5	–	1,25	5
Antibiótico	Tetraciclina 3,906 ug/mL			Tetraciclina 1,953ug/mL			Tetraciclina 15,625 ug/mL
DP: <i>Dacryodes peruviana</i>							
DP1: Aceites de la primera recolección							
DP2: Aceites de la segunda recolección							
DP3: Aceites de la tercera recolección							

Elaboración: La autora

Como podemos apreciar en la tabla 12, los resultados obtenidos para las bacterias del aceite esencial del fruto de *Dacryodes peruviana* no mostro inhibición en las bacterias gram-negativas. Mientras que en la bacteria *Staphylococcus aureus*, bacteria gram positiva presentó una CMI de 0,625mg/mL en la primera destilación.

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

- ❖ **Buena:** CMI <100 µg/mL (0.1 mg/mL)
- ❖ **Moderada:** CMI de 100 a 500 µg/mL(0,1-0,5 mg/mL)
- ❖ **Débil:** CMI de 500 a 1000 µg/mL (0,5-1 mg/mL)
- ❖ **Inactiva :** más de 1.000 µg/mL (1mg/mL)

De acuerdo a la clasificación de Holetz podemos mencionar que el aceite en estudio es débil frente a dicha bacteria. Es decir que la bacteria de *Staphylococcus aureus* resulta más sensible a la acción del aceite esencial.

No se ha encontrado estudios de la actividad biológica del aceite de la especie *Dacryodes peruviana* contra los microorganismos utilizados, sin embargo existen estudios de la familia Burseraceae. En un estudio reportado por (Provan et al., 1987) se encontró que el aceite de *B. graveolans* presentó efecto inhibitorio frente a *S. aureus* a una concentración de 150 mg/mL y *B. subtilis* a una concentración de 180mg/mL. Este estudio no mostró efecto antimicrobiano sobre las bacterias Gram (-).

Entre los monoterpenos a los cuales se les atribuye propiedades antibacterianas, podemos citar: α -terpineno, α -felandreno, p-cimeno, sabineno, entre otros (Benites et al., 2011; Sánchez et al., 2009).

Teniendo en cuenta la presencia de diferentes compuestos químicos en los aceites esenciales, es probable que la actividad antibacteriana sea atribuible a la concentración química de los principales componentes, pero también a la existencia de componentes minoritarios en el aceite esencial. Según Jiang et al. (2011) esta complejidad en la composición química es lo que dificulta explicar la actividad biológica del aceite esencial.

Existen varios factores que influyen sobre los resultados tales como: el volumen, la concentración, las condiciones de incubación, la variación en la composición química de los aceites de acuerdo con los géneros y las especies de las plantas o por la procedencia geográfica (Zapata et al., 2010).

3.6. Actividad antioxidante del aceite esencial del fruto *Dacryodes peruviana*.

3.6.1. Método ABTS⁺.

3.6.1.1. Lectura de los estándares Trolox/BHT.

Al calcular la capacidad antioxidante de la muestra de aceite esencial del fruto *Dacryodes peruviana*, mediante el método de ABTS⁺. a diferentes concentraciones de los estándares de referencia (Trolox y BHT), se logró obtener datos de absorbancia, los cuales fueron reemplazaron en la ecuación (2), encontrando así los valores de porcentaje de disminución respectivos para cada concentración como lo podemos observar en la tabla 13.

$$\% Dis. = \left\{ \left(\frac{Abs.blanco - Abs.muestra}{Abs.blanco} \right) * 100 \right\} \quad 2$$

Tabla 13. Datos del método ABTS+ para los estándares TROLOX y BHT.

DATOS ABTS				
TROLOX			BHT	
Concentración (ppm)	Absorbancia Determinada	Porcentaje de Disminución (%)	Absorbancia Determinada	Porcentaje de Disminución (%)
1000	0,554	50,536	0,352	68,174
800	0,649	42,054	0,586	47,016
600	0,737	34,196	0,606	45,208
450	0,768	31,429	0,737	33,363
300	0,878	21,607	0,850	23,146
150	0,928	17,143	0,933	15,642
25	0,958	14,464	1,032	6,691
0	0,966	13,750	1,045	5,515
Absorbancia de la solución de trabajo		1,120	1,106	

Elaboración: La autora

3.6.1.2. Lectura de las muestras del aceite esencial.

En la tabla 14, se detallan los resultados obtenidos de la actividad antioxidante del aceite esencial del fruto *D. peruviana*, en la cual se describe las concentraciones analizadas, determinando a su vez el porcentaje de disminución obtenido para cada dilución.

Tabla 14. Datos del método ABTS+ para el aceite esencial.

ACEITE (ABTS)			
Abs. Blanco	Concentración (ppm)	Absorbancia Determinada	Porcentaje de Disminución (%)
1,110	1000	1,035	6,757
	500	1,035	6,757
	100	1,054	5,045
	50	1,065	4,054
	25	1,047	5,676
	12,5	1,071	3,514
	5	1,087	2,072
	0	1,104	0,541

Elaboración: La autora.

Los resultados obtenidos en la tabla 14 nos permiten comprobar que el aceite esencial del fruto de *D. peruviana* no presenta actividad antioxidante ya que el aceite presente en su mayor concentración (1000 ppm) tiene un porcentaje de disminución de 6,75% en comparación a los valores frente al radical ABTS donde se usaron estándares de referencia y su concentración máxima de 1000ppm fue de 68,17%. Para poder decir que un aceite esencial tiene actividad antioxidante debe ser este igual o mayor al 50 % de disminución.

3.6.2. Método radical DPPH.

3.6.2.1. Lectura de los estándares Trolox/BHT.

Al calcular la capacidad antioxidante de la muestra de aceite esencial del fruto *Dacryodes peruviana*, mediante el método de radical DPPH, a diferentes concentraciones de los estándares de referencia (Trolox y BHT), se logró obtener datos de absorbancia, los cuales fueron reemplazaron en la ecuación (2) descrita en la metodología, encontrando así los valores de porcentaje de disminución respectivos para cada concentración como lo podemos observar en la tabla 15.

Tabla 15.Datos del método DPPH para los estándares TROLOX y BHT

DATOS DE DPPH				
TROLOX			BHT	
Concentración (ppm)	Absorbancia Determinada	Porcentaje de Disminución (%)	Absorbancia Determinada	Porcentaje de Disminución (%)
1000	0,540	50,230	0,188	82,784
800	0,718	33,825	0,397	63,645
600	0,816	24,793	0,420	61,538
450	0,865	20,276	0,524	52,015
300	0,904	16,682	0,611	44,048
150	0,923	14,931	0,775	29,029
25	0,947	12,719	0,893	19,231
0	0,961	11,429	0,882	18,223
Absorbancia de la solución de trabajo		1,085	1,092	

Elaboración: La autora.

3.6.2.2. Lectura de las muestras del aceite esencial.

En la tabla 16, se detallan los resultados obtenidos de la actividad antioxidante del aceite esencial del fruto *D. peruviana*, en la cual se describe las concentraciones analizadas, determinando a su vez el porcentaje de disminución obtenido para cada dilución.

Tabla 16.Datos del método DPPH para el aceite esencial

ACEITE (DPPH)			
Abs. Blanco	Concentración (ppm)	Absorbancia Determinada	Porcentaje de Disminución (%)
1,085	1000	0,785	27,650
	500	0,801	26,175
	100	0,861	20,645
	50	0,891	17,880
	25	0,912	15,945
	12,5	0,909	16,221
	5	0,918	15,392
	0	0,941	13,272

Elaboración: La autora.

Al calcular las muestras de aceite esencial del fruto *D. peruviana*, se observó que a las diferentes concentraciones realizadas el porcentaje de disminución en el método DPPH en ningún caso alcanzaron valores superiores al 50 %, evidenciando que el porcentaje de disminución a su mayor concentración (1000 ppm) fue de 27,65%, podemos deducir

que en las muestras evaluadas no se encuentran presentes compuestos que atrapen radicales libres, lo cual puede explicar que no existe actividad antioxidante en el aceite esencial analizado.

Los resultados obtenidos de actividad antioxidante 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%.

En la actualidad, no hay reportes que muestran la actividad antioxidante del aceite esencial del fruto *D. peruviana*, sin embargo existen reportes científicos que muestran esta actividad antioxidante de la familia Burseraceae. La actividad antioxidante del aceite esencial *Dacryodes peruviana* analizada en este trabajo mostró porcentajes de reducción bajos al 50%. La baja actividad antioxidante obtenida, concuerda con lo reportado por (Gutiérrez et al., 2014) quienes analizaron el aceite esencial de *Bursera simaruba* por la técnica DPPH y ABTS y encontraron una inhibición del radical a concentraciones bajas.

Las bajas cantidades de compuestos fenólicos en el aceite esencial pueden correlacionar con las bajas cantidades o con la no presencia de antioxidantes observadas en esta investigación. Por lo tanto los compuestos muy reactivos reducen los radicales más activos, mientras que otros con menor reactividad actúan regenerando los de primera línea (Thomas, 2000).

CONCLUSIONES

- Los valores de las propiedades físicas obtenidas fueron: densidad relativa de 0,846 g/cm₃, el valor medio del índice de refracción fue de 1,4751 y la actividad óptica de +12,154°
- En la composición química del aceite esencial se identificaron 44 compuestos, en la columna DB-5ms se identificaron 32 compuestos con un porcentaje de identificación del 98,37% y en la columna HP-Innowax se identificaron 31 compuestos con un porcentaje de identificación de 96,25%
- Se identificaron 8 compuestos mayoritarios en el aceite esencial del fruto *Dacryodes peruviana* los cuales fueron: α-Phellandrene (50,32%), Limonene (23,03%), β-Phellandrene (8,27%), Terpinolene (5,23%), p- cymene (3,06%), β-Pinene (2,57%) y Sabinene (1,44%).
- El compuesto predominante fue α-Phellandrene con un porcentaje de 50,32% el cual se presentó en ambas columnas DB-5ms y HP-Innowax.
- Los resultados de la actividad antibacteriana del aceite esencial presento una actividad débil frente a *Staphylococcus aureus* en la primera destilación (0,625 mg/mL) mientras que para las cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* y *Enterococcus faecalis* fue inactivo frente a las concentraciones evaluadas.
- El aceite esencial obtenido del fruto *D. peruviana* no presento actividad antioxidante frente a los métodos ABTS⁺ y DPPH.

RECOMENDACIONES

- ❖ Realizar estudios posteriores sobre los posibles factores externos que hacen que haya una variación en la composición química cualitativa y cuantitativa del aceite esencial de una especie.
- ❖ Realizar estudios sobre la especie *Dacryodes* para un análisis de sus componentes químicos y así diversificar los beneficios de uso cosmético, farmacéutico, etc.
- ❖ Realizar también más estudios científicos que puedan validar las propiedades atribuidas a la familia Burseraceae.
- ❖ Integrar más microorganismos de estudio de interés en salud humana, para la evaluación antimicrobiana.

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- AFNOR, (1982). (ISO 279:1998), Aceites esenciales. Determinación de la densidad Relativa a 20°C.Método de referencia
- AFNOR , (1988). (ISO 280:1998), Aceites esenciales. Determinación del índice de refracción. Método de Referencia
- Agnihotri, S., Wakode, S., Ali, M. (2012). Essential oil of *Myrica esculenta* Buchottam: composition, antimicrobial and topical anti-inflammatory activities. *Vol.26*.
- Ajibesin, K. K., Ekpo, B. A., Bala, D. N., Essien, E. E., & Adesanya, S. A. (2008). Ethnobotanical survey of Akwa Ibom State of Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(113), 387–408.
- Albaladejo, Q. (1999). El Aceite Esencial de limón producido en España. Contribución a su evaluación por Organismos Internacionales. Universidad de Murcia, Facultad de Veterinaria, Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología. España. 34, 35, 103
- Aldama LI, L., Salinas S, D., Valdés E. Ma. E., Gutiérrez, O. M. y Valladares, C. M. G (2010). Evaluación bioinsecticida de extractos de *Bursera copalifera* (D. C.) Bullock y *Bursera grandifolia* (SCHLTDL.) Engl. En gusano cogollero *Spodoptera*. *Revista Polibotanica México*, Vol 29.
- Andrade, V., & Silva, J. (2004). Caracterización de *Klebsiella Pneumoniae* productora de la β -lactamasa SHV-en una unidad de cuidados intensivos. *Revista de Salud Pública México*, Vol.: 46, N. 6.
- Andrews, J. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48 vol. 1, 5-16. .
- Arias, T. A., Valverde, V. M., y Reyes S. J. (2000). Las plantas de la región de Zapotitlán de Salinas, Puebla. Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. 1-80p.
- Baiz, R. (1999). The Healing Power of Essential Oils (Fragrance secrets for everyday). First Edition. California. USA, 202, 47-50
- Bandoni, A. (2000). *Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores*. Argentina:: Red de Editoriales Universitarias p.p. 29, 43, 94,-96, 149-171, 197-232.

- Bandoni, A. (2002). *Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. Su Aprovechamiento Industrial Para la Producción de Aromas y Sabores*. Buenos Aires, Argentina, 139, 95-110
- Baratta, M. (1998). Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, and coriander essential oils. *Journal of Essential oils research, Vol. 16*: 618-627
- Battle, M. (2005). Meningitis bacteriana y *Pseudomonas aeruginosa*: a propósito de un caso. *Revista Cubana Médica, Vol. 57*: 3.
- Benites, J. B., F.; Rojas, M.; Fuentes, R.; Moiteiro, C.; Florencia V. (2011). Composition and antimicrobial screening of the essential oil from the leaves and stems of *Senecio atacamensis* Phil. from Chile. *Journal of the Chilean Chemical Society* 56(2), 712 – 714.
- Benitez, A. (2016). Área de recolección de la especie *Dacryodes peruviana*. Museo de Colecciones Biológicas. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja
- Berger, Ralf. (2007) "Flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability". Springer. Germany.
- 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.
- Bonfil, S. C., Mendoza, H., y Ulloa, N. J. A (2007). Enraizamiento y formación de callos en estacas de siete especies del género *Bursera*. *Agrociencia. 41*: 103-109.
- Bruneton, J. (1991). Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Technique et Documentation – Lavoisier: . Zaragoza. España. Acribia. p.157-172.
- Bustos, J., Hamdan, A., Gutiérrez, M. (2006). *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Revista Biomédica, Vol. 17*: 287-305.
- Canales, M., T, Hernández., J, Caballero., A Romo de Vivar., A Durán., R Lira (2006). *Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán–Cuicatlán, Puebla*. México: Acta Bot. Mex. 75:21–43.
- Castañeda, C., Ramos, L., & Ibáñez, V. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante. *Revista Horizonte médico, VII(1)*, 56-72.
- Castro, S. (2006). Comparación de diferentes métodos para identificar las especies del género *Proteus*. *Revista Argentina de Microbiología, Vol. 38*: 119-124.
- Carbonnel F (1998). Naturalmente esencial. Introducción a la aromaterapia. Barcelona: Martorell, 304- 58,67.

- Coloma, L., y Ron, S. (2001). *Ecuador megadiverso: anfibios, reptiles, aves, mamífero/ Megadiverse Ecuador: amphibians, reptiles, birds, and mammals*. Centro de Biodiversidad y Ambiente, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito.
- Correa, M.(2014). Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* (Ruiz & Pav.) G. Don de la familia Chloranthaceae de la provincia de Loja, a partir de individuos con flores femeninas. UTPL. Loja-Ecuador
- Costa-Batlloori, D (2003). Antioxidantes naturales en alimentación animal. conferencia inaugural del curso académico 2003-2004. Real Academia de Ciencias Veterinarias.Consultado el 12 de Enero del 2016. Disponible en <http://racve.es/actividades/ciencias-basicas/2003-10-08PereCostaBatllori.htm>
- Chamba, F. (2015). Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de individuos con flores masculinas de la especie *Hedyosmum racemosum* de la provincia de Loja. UTPL. Loja-Ecuador.
- Dike, I. P., Obembe, O. O., & Adebisi, F. E. (2012). Ethnobotanical survey for potential anti-malarial plants in south-western Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology*, 144(143), 618–626.
- Dudareva, N., & Pichersky, E.,. (2006). *Biology of Floral Scent*. Taylor & Francis Group:New York.pp.:55-71.
- Dürbeck, K. (1996). Posibilidades de uso y comercialización de productos no maderables del bosque húmedo tropical, en: Informe del Taller “Posibilidades de uso y Comercialización de productos no maderables del Bosque Húmedo Tropical” Anexos. PROFORS, PROMERCADOS. Quito, 7 al 9 de mayo de 1996.
- Flores, P. S. (1988). *Old managed fallows at Brillo Nuevo*. In: (Denevan, W.M. & Padoch, C. Eds.) *Swiddem-Fallow Agroforestry in the Peruvian Amazon Advances in economic Botany* (Vol. 5). The New York Botanical Garden: USA.
- Flores, P. S. (1996). Diagnóstico de frutales nativos en la Región Loreto: Descripción dendrológica. apuntes.Perú. pág.96
- Flores, P. (2015). "Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Piper ecuadorensis* del cantón Saraguro". UTPL. Loja, Ecuador.
- Forzza, R. C. (2010). Lista de espécies Flora do Brasil . Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.Brazil. 274, 58-63

- Garcia, M. (2013). Estudio de la actividad Antimicrobiana y Antioxidante del aceite esencial del rizoma de *Renealmia thyrsoides* subsp. *thyrsoides* (Zingiberaceae). Quito- Ecuador. pág. 116.
- García, O. X. (2002). Efectos del ácido indolbutírico y de la estratificación en la formación de callos y de raíces en estacas de *Bursera simaruba* (L.) Sarg., *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex. Walp. y *Omphalea oleífera* Hemsl., tres especies potencialmente útiles para la restauración ecológica. Tesis de Licenciatura. Facultad de ciencias,. UNAM, 66 p.
- Goldstein, L. (1974). Primer Simposium Panamericano sobre Sensores Remotos. Universidad de Texas. 505 páginas.
- Granados, C., Yáñez, X., & Santafé, G. (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. Universidad de Pamplona, Colombia. Bistua*, 1 (vol. 10), p. 12-23.
- Guevara, J., Cásares, A., Valencia, E. (2000). Significado clínico de la presencia de *Enterococcus* en secreción vaginal y anal de la Facultad de Medicina. *Universidad Mayor de San Marcos, Vol.: 2000, N0 3: 223-226*.
- Gutiérrez, D., Mendoza, S., Rodríguez, V & Castañeda, R. (2014). Chemical constituents and antioxidant activity of extracts obtained of *Bursera simaruba*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, Vol: 13 (6): 527 - 536*.
- Gutiérrez, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes del mal olor. 122
- Harris, D. (2007). Análisis químico cuantitativo. 3ª Edición (*Sexta edición original*). Editorial Reverté. España
- 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.
- Hui, Z., Chen, F., Wang, X, Yao, H.Y (2006). Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidants constituents. En: *Food Research International*. 39:833-839.
- Jiang, Y. W., N.; Fua, Y-J.; Wang, M.; Luo, M.; Zhao, Ch-J.; Zu, Y-G.; Liu, X-L. . (2011). Composition and antimicrobial screening of the essential oil from the leaves and stems of *Senecio atacamensis* Phil from Chile. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 56(2), 712 – 714.

- Jorgensen, P. M., & S. León-Yáñez. (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador. *Missouri Botanical Garden Press, St. Louis*, 302-315
- Kuskoski, M., Asuera, A., & Troncoso, A. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y tecnología de alimentos*, 726-732.
- Margulis, L., & Sagan, D. (2012). El proceso de nutrición en las plantas. 2da Edición. Boston. USA pag 258, 242-251
- Martínez, A. (2003). "Aceites Esenciales". Universidad de Antioquia. Docente área de Salud. Colombia, 96, 25-27
- Martínez, A. (2001). *Aceites esenciales*. Universidad de Antioquia. Facultad Química Farmacéutica Medellín.
- Merino, G. (2015). "Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica y antioxidante del aceite esencial de la especie *Piper Lineatum* de la provincia de Zamora Chinchipe". Loja. Ecuador
- Miller, J.m. (1998). Basic Gas Chromatography Techniques in Analytical Chemistry. New York. John Wiley and Sons, Inc. 2nd.ed. New York. USA.
- Molares, S., González, S., Ladio, A., Castro, M (2009). Etnobotánica, anatomía y caracterización físico-química del aceite esencial de *Baccharis obovata* Hook. Et Arn. (Asteraceae: Astereae). *Acta Botánica Brasilica, Volumen 23. N° 2*, págs. 578-589.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin. *J.Sci. Technol*, XXVI(2), 211-219.
- Muñetón, P. (2009). Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. *Revista unax mx*, Vol 10(No 9).
- Muñoz, F. (2002). *Plantas medicinales y aromáticas* (4ta ed.). España: Artes gráficas Cuesta, S.A.
- Ndah, N. R., Egbe, E. A., Bechem, E., Asaha, S., Yengo, T., Chia, E. L. (2013). Ethnobotanical study of commonly used medicinal plants of The Takamanda Rainforest South West, Cameroon. *African Journal of Plant Science*, 7(1), 21–34.
- Olaya, J., & Méndez, J. (2003). Guía de plantas y productos medicinales. *Area de Ciencia y Tecnología. Corpoeduagro*. Bogotá. Colombia
- Oliva, M. (2011). Actividad Biológica de los aceites esenciales: su aplicación como Fitofármaco. Congreso de la Facultad de Medicina. *UNAM. México*

- Olguín, L. (2004) *Métodos en biotecnología. Cromatografía de gases*. Universidad nacional autónoma de México. 46, 19-20
- Onana, J. M. (2008). A synoptic revision of *Dacryodes* (Burseraceae) in Africa, with a new species from Central Africa. *Kew Bulletin*. 63(63), 385–400.
- Patiño, J. (2006). *Metabolismo, Nutrición y Shock*. Bogota, Colombia: *Medica Panamericana*.
- Pérez, V. (2006). visión, luz y color. *Universidad de Cantabria. Departamento de Ingeniería de comunicaciones. Vol 2,31*
- Pino, N., Melendez, E., & Stashenko, E. (2009). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Piper lanceaefolium*, planta usada tradicionalmente en Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 8, 301-304.
- Pozo, X., & Naranjo, B. (2006). *Extracción, caracterización y determinación de la actividad antibacteriana y antimicótica del aceite esencial de Hierba Luisa (Cymbopogon Citratus (DC) stapf*. Ingeniero en Biotecnología., Escuela Politécnica del Ejército, Ecuador: s.n.
- Plaza, E. (2011). Curso de aceites esenciales: Química y proceso de producción. *Jardín botánico de Bogotá. Centro de Investigación y Desarrollo científico. Bogotá*.
- Provan, G., Gray, P. (1987). Monoterpenich resins from some Kenya Burseraceae *Flavour and Fragrance*. 2, 115-118.
- Rios, M., M.J, Koziol., H, Borgtoft Pedersen & Granda. (2007). *Plantas útiles del Ecuador: aplicaciones, retos y perspectivas/Useful Plants of Ecuador: applications, Challenges, and Perspectives*. (Ediciones Abya-Yala. ed.). Quito, Ecuador.
- Rodriguez, G., & Angeles, M. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Revista de Salud pública de México, Vol.: 44, N05*.
- 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*.
- Rosales, J. (2012). "Determinación de la composición química, propiedades físicas y actividad biológica del aceite esencial de *Baccharis obtusifolia* Kunth (Asteraceae) de la provincia de Loja". UTPL. Loja-Ecuador.
- Rosillo, M. (2012). "Determinación fisicoquímica y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Baccharis latifolia* (Asteraceae) de la provincia de Loja. Loja, Ecuador.

- Ryman, D. (1995). "Aromaterapia. Enciclopedia de las plantas aromáticas y de sus aceites esenciales. Los usos en belleza, cocina y salud". Kairós S.A. España,.
- Rzedowski, J., y F. Guevara-Féfer. (1992). Burseraceae. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. 3: 1–46.
- Salas, M., Zaragocin, R.L., Zaragoza T. (2006). Extracción, caracterización físico química y determinación de componentes del aceite esencial del fruto de palo Santo (*Bursera graveolans*) de tres lugares diferentes de la provincia de Loja. El Empalme, La Ceiba y Yaraco. UTPL.
- Salazar, C. (2009). Evaluación de agentes antioxidantes en extractos de flor de jamaica y aceite esencial de laurel. *Colección de Tesis Digitales Universidad de las Américas Puebla*.
- Sánchez, Y., Pinooriella, M., Correa. (2009). Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* kunth (caisimón de anís). *Revista de Protección Vegetal* 24(1): 39 – 46.
- Sharafi, S., Rasooli, I., & Astaneh, S. (2010). Analizan los efectos beneficiosos del aceite esencial de menta y sus posibles usos. *Pharmacognoc magazine*, 147-153.
- Soejarto, D., Gyllenhaal, Ch. . (1997). *Información etnomédica en el descubrimiento y desarrollo farmacéutico. Libro de Resúmenes VI Congreso Italo-latinoamericano de Etnomedicina*. Guatemala: Sociedad Italo-latinoamericana de Etnomedicina.
- Soto, R., Vega, G., Tamajón (2002). Instructivo técnico del cultivo de *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf (caña santa). *Rev. Cubana Plantas Med*, 7:89–95.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. 3ª Ed. Sinauer Associates Inc, Publishers: Massachusetts pp.:171-192, 285-291.
- Tortora, G. (2007). *Principios de anatomía y fisiología*. 7ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Thomas, M. J. (2000). The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition*, 16(7): 716-718.
- Uribe, C., & Suárez, M. (2006). Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. *Colombia Médica*, Vol.: 37: 151-158.
- Vargas, M. (2002). *Ecología y biodiversidad del Ecuador*. Quito, Ecuador. 232 p, 156-162
- Vituro, C., Bandoni, A., Dellacassa, E., Serafini, L. y Elder, H. . (2010). Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática latinoamericana- Problemática *Schinus* en Latinoamérica. Proyecto CYTED IV.20. Recuperado el 09 de agosto de 2011, de <http://www.pucrs.br/edipucrs>.
- Weast, R. (2010). *Handbook of Chemistry and Physics*. 90 th ed. CRC Press, USA. p.C-242-362.

- Wills, R. (2002). Las plantas medicinales: sabiduría ancestral en el mundo de hoy. *EUFI*C.
- Zapata, B. D., C; Stashenko, E; Betancur, L; Mesa, A. (2010). Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. *Revista Iberoamericana de Micología, Volumen 27*(Nº2, págs.101-103.).

ANEXOS

ANEXO I

DETERMINACIÓN DE HUMEDAD RELATIVA

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:

$$Hm = \frac{(m_1 - m_2)}{(m_1 - m)} * 100 \quad (3)$$

Dónde:

Hm: %de humedad

m: peso de la cápsula vacía (gr)

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

m₂: peso de la cápsula + muestra seca (gr).

ANEXO II

DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO

Para calcular el porcentaje de rendimiento (%R) de los aceites esenciales evaluados se correlacionó el volumen de aceite esencial obtenido por cada destilación, con la cantidad de material vegetal, mediante fórmula (4)

$$\%R = \frac{\text{Volumen (mL)}}{\text{Peso (gr.)}} * 100 \quad (4)$$

Dónde:

R: % de Rendimiento.

V: Volumen del aceite esencial extraído en mL.

P: Peso de la materia vegetal empleada en la destilación.

ANEXO III
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 $20^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$.
- 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 fórmula (5)

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \quad (5)$$

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 IV
DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN
(Método de Referencia)

Según la AFNOR NF T 75-112 /1988

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 no 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 $\pm 0.2^\circ\text{C}$ y debe mantenerse a $\pm 0.2^\circ\text{C}$.

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 (6).

$$n_D^{t'} = n_D^t + 0.0004 (t' - t) \quad (6)$$

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 V

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ÓPTICA

PRINCIPIO:

Siempre que se trabaje con aceites sólidos o parcialmente sólidos, aceites de alta viscosidad en un rango de temperatura, o aceites de colores fuertes, la determinación transcurre en una solución del aceite.

DEFINICIONES:

Rotación óptica de un aceite esencial: $\alpha'D$

Ángulo expresado en mili radianes y/o grados del ángulo descrito por la polarización plana de una radiación luminosa cuya longitud de onda es $589.3\text{nm} \pm 0.3\text{nm}$, correspondiente a las D líneas de sodio, cuando el trayecto de luz atraviesa 100nm del espesor de un aceite esencial, a ciertas temperaturas. Nota: Cuando la determinación ocurre con diferentes espesores el valor de la rotación óptica deberá ser computado en relación al espesor de 100nm. También la medida acordada por el Faraday magneto – óptico en principio es posible. El espesor de la muestra en este caso es de 10nm.

Rotación de un aceite esencial en solución (rotación específica α).

La rotación óptica de una solución de aceite esencial dividida para la masa de aceite esencial por unidad de volumen

REACTIVOS:

Los reactivos deben ser de grado analítico. Use agua destilada o de equivalente pureza.

SOLVENTE:

(Solo para aceites esenciales que necesiten ensayarse en solución). Se utilizará preferiblemente etanol al 95% en volumen, es necesario considerar la rotación óptica del mismo

APARATOS:

Polarímetro: Con una precisión no menor de $\pm 0.5\text{mrad}$ ($\pm 0.03^\circ$) y ajustado de 0° a 180° con agua.

El polarímetro constará de un plato de cuarzo de rotación óptica conocida, si esto es inaccesible, con una solución acuosa con un contenido de 26g de sacarosa anhidra pura por 100ml de solución. La rotación óptica de esta solución es de +604 mrad en 200mm de pasta a una temperatura de 20°C. El instrumento deberá ser usado en la oscuridad.

La fuente de luz: Comprende un dispositivo a una longitud de onda de $589.3\text{nm} \pm 0.5\text{nm}$ con una lámpara de vapor de sodio.

Tubos polarimétricos: Usualmente de $100\text{mm} \pm 0.5\text{mm}$ de longitud. Para muestras ligeramente coloreadas o de baja rotación óptica se deben usar tubos de más o menos $200\text{mm} \pm 0.5\text{mm}$, tubos de $50\text{mm} \pm 0.05\text{mm}$ o $10\text{mm} \pm 0.05\text{mm}$ o menos si es necesario para muestras fuertemente coloreadas. En la determinación se debe trabajar a 20°C o anotar la temperatura específica, utilice un tubo de ensayo de pared gruesa, equipado con un termómetro, asegurar la circulación del agua a la temperatura requerida. Para la determinación de la temperatura ambiente ver el tipo de tubo de ensayo que se debe utilizar, si bien es aconsejable utilizar los descritos en la parte anterior.

Termómetro: Graduado en 0.2°C o 0.1°C permitiendo la determinación de temperaturas entre 10°C y 30°C

PROCEDIMIENTO:

Es necesario mantener la temperatura de la muestra a $20^\circ\text{C} \pm 0.2^\circ\text{C}$ o especificar la temperatura, para la muestra que va en el tubo polarimétrico apropiado. Mantener el agua que está circulando con un control termostático, mantener la temperatura especificada durante la determinación. Llenar el tubo con la muestra y asegurarse de la ausencia de burbujas. Coloque el tubo en el polarímetro y lea la dextro rotación (+) o la levo rotación (-) del aceite que en la escala muestra el instrumento.

RESULTADOS:

Cálculos y fórmulas

La rotación óptica expresada en miliradianes o en grados del ángulo está dada por la ecuación 7.

$$\alpha'D = A/I * 100 \quad (7)$$

A = es el valor del ángulo de rotación en mrad o grados del ángulo.

I = es la longitud del tubo usado en mm.

Marque como (+) la rotación hacia la derecha en el sentido de las manecillas del reloj y como (-), en el sentido contrario a las manecillas del reloj. Cuando por los tubos de pared gruesa la circulación de agua no es correcta, es necesario aplicar factores de corrección apropiados o de acuerdo al aceite ensayado (para aceites esenciales de cítricos y para otros se conocen factores de corrección específicos).

Nota: Los factores de corrección deberán ser dados en las especificaciones para cada aceite.

Rotación óptica de un aceite en solución, “Rotación específica”

La rotación específica expresada en mili radianes o grados del ángulo está dada por la ecuación 8.

$$[\alpha] = \alpha'D/C \quad (8)$$

Dónde:

$\alpha'D$ = es la rotación óptica del aceite en solución.

C = concentración de la solución del aceite, en gramos de aceite por ml de solución.

Con el valor de la actividad óptica leída en el equipo se aplica la fórmula 9 que se muestra a continuación para obtener la actividad óptica calculada.

$$\alpha = \left(\frac{\alpha l}{l * c} \right) - \alpha s \quad (9)$$

Dónde:

α = Actividad óptica calculada

αl = Actividad óptica leída

l = Dimensión del tubo (dm)=1

αs = Actividad óptica del solvente=0,00 o Z

c = Concentración muestra (gr/ml)

ANEXO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS INDICE DE KOVATS

^b ref. 1; ^c ref. 2; ^d ref. 3; ^e ef. 4; ^f ref. 5; ^g ref. 6; ^h ref. 7; ⁱ ref. 8; ^j ref.9; ^k ref. 10; ^l ref. 11; ^m ref. 12

1. Adams, R.(2009) Identification of Essencial oil componensts by chromatography/ MS Spectrometry. Vol. 4
2. Adams, R.P.; (2006) González Elizondo, M.S.; González Elizondo, M.; Slinkman, E., DNA fingerprinting and terpenoid analysis of *Juniperus blancoi* var. *huehuentensis* (Cupressaceae), a new subalpine variety from Durango, Mexico, *Biochem. Syst. Ecol.*, 34, 205-211
3. Adams, R.P.; (2000) *Systematics of Juniperus section Juniperus based on leaf essential oils and random amplified polymorphic DNAs (RAPDs)*, **Biochem. Syst. Ecol.**, 28, 515-528
4. Demirci, B., Hüsnü Can Başer, K., Yıldız, B. and Bahçecioğlu, Z. (2003), Composition of the essential oils of six endemic *Salvia* spp. from Turkey . *Flavour Fragr. J.*, 18: 116–121. doi: 10.1002/ffj.1173
5. Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R. (2003). Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Rev. Acad. Colomb. Cienc*, 27(105), 579-597.
6. Tomi, F., Barzalona, M., Casanova, J., & Luro, F. (2008). Chemical variability of the leaf oil of 113 hybrids from *Citrus clementina* (Commun)× *Citrus deliciosa* (Willow Leaf). *Flavour and fragrance journal*, 23(3), 152-163.
7. Aidi Wannes, W., Mhamdi, B., & Marzouk, B. (2009). Variations in essential oil and fatty acid composition during *Myrtus communis* var. *Itálica* fruit maturation. *Food chemistry*, 112(3), 621-626
8. Paolini, J., Muselli, A., Bernardini, A. F., Bighelli, A., Casanova, J., & Costa, J. (2007). Thymol derivatives from essential oil of *Doronicum corsicum* L. *Flavour and fragrance journal*, 22(6), 479-487.
9. Marongiu, B.; Porcedda, S.; Piras, A.; Sanna, G.; Murreddu, M.; Loddo, R. (2006). Extraction of *Juniperus communis* L. ssp. *nana* Willd. essential oil by supercritical carbon dioxide. *Flavour and Fragrance Journal*. Volumen 21, págs.148-154.

10. Silva, W.; Doria, G.; Maia, R.; Nunes, R.; Carvalho, G.; Blank, A.; Alves, P.; Marcal, R.; Cavalcanti, S. (2008). Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresource Technology*. Volumen 99, págs.3251-3255.
11. Muñoz-Acevedo, A., Stashenko, E. E., Kouznetsov, V. V., & Martínez, J. R. (2011). Differentiation of leaf and flower extracts of basil (*Ocimum* sp.) varieties grown in Colombia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 14(4), 387-395.
12. Moreno, P.; Lima, M.; Sobral, M.; Young, M.; Cordeiro, I.; Apel, M.; Limberger, R.; Henriques, A. (2007). Essential oil composition of fruit colour varieties of *Eugenia brasiliensis* Lam. *Scientia Agricola* (Piracicaba Braz). Volumen 64. N° 4, págs.428-432.

ANEXO VI

PORCENTAJE DE AREA

[contents]							
count=2							
Name= D:\MSDCHEM\DATA\2015\ACEITES\NATHALY ANDRADE\DB5MS\C11_2.D							
[PBM Apex]							
Time= Wed Sep 02 09:42:14 2015							
Header	PK	RT	Area Pct	Library/ID	Ref	CAS	Qual
1=	1	5,8558	3,1671	THUJENE	32150	002867-05-2	94
2=	2	6,0835	8,8972	ALPHA.-PINENE, (-)- \$Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6,6-trimethyl- (CAS) \$Pinene \$	32180	000080-56-8	96
3=	3	6,6301	0,0773	Camphene \$Bicyclo[2.2.1]heptane, 2,2-dimethyl-3-methylene- (CAS) \$3,3-Dime	32125	000079-92-5	97
4=	4	7,5145	3,0759	Sabinene \$Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1-(1-methylethyl)- (CAS) \$4(10)-	32166	003387-41-5	97
5=	5	7,6549	1,5254	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)- \$2(10)-Pinene, (1S,5S)-(-	32196	018172-67-3	97
6=	6	8,247	0,9371	beta.-Myrcene \$1,6-Octadiene, 7-methyl-3-methylene- (CAS) \$2-Methyl-6-met	31858	000123-35-3	95
7=	7	8,8771	26,0523	l-Phellandrene \$1,3-Cyclohexadiene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)- (CAS) \$p-Me	31925	000099-83-2	95
8=	8	9,287	0,2112	alpha.-Terpinene \$1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)- (CAS) \$1,3	31906	000099-86-5	97
9=	9	9,6476	0,5789	Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	29888	000099-87-6	95
10=	10	9,8601	34,9623	dl-Limonene \$Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)- (CAS) \$1-P-MENTHA	31986	000138-86-3	98
11=	11	10,2245	0,249	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-, (R)- (CAS) \$D-1,8(9)-P-MENTHADIEN	31987	005989-27-5	94
12=	12	10,6648	0,0358	Cyclopropane, 1,1-dimethyl-2-(3-methyl-1,3-butadienyl)-	31878	068998-21-0	86
13=	13	11,0709	0,5265	gamma.-Terpinene \$1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)- (CAS) \$1	31956	000099-85-4	96
14=	14	12,2779	16,441	ALPHA.-TERPINOLENE \$Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)- (CAS) \$	32041	000586-62-9	98
15=	15	14,9804	0,0165	spiro[2.4]heptane-5-carboxylic acid (CAS)	35718	109532-61-8	37
16=	16	16,6238	0,0873	3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-	52818	000562-74-3	96
17=	17	23,2395	0,0094	alpha.-Terpinene \$1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)- (CAS) \$1,3	31911	000099-86-5	64
18=	18	23,3837	0,143	delta.-Elemene \$Cyclohexene, 4-ethenyl-4-methyl-3-(1-methylethenyl)-1-(1-me	121227	020307-84-0	96
19=	19	25,0386	0,0138	alpha.-Copaene \$Tricyclo[4.4.0.0(2,7)]dec-3-ene, 1,3-dimethyl-8-(1-methylethyl)	121677	003856-25-5	59
20=	20	26,8036	0,0395	Cyclohexane, 1,5-diethenyl-3-methyl-2-methylene-, (1.alpha.,3.alpha.,5.alpha.)-	62824	074742-35-1	64
21=	21	29,3694	0,4959	GERMACRENE-D	121788	023986-74-5	99
22=	22	29,6616	0,0111	3,4-Dihydro-6-fluorocoumarin	66900	000000-00-0	53
23=	23	29,7945	0,0054	1,3-Benzenediol, 4,5-dimethyl- \$Resorcinol, 4,5-dimethyl- \$o-Xylorcinol \$1,2-D	33371	000527-55-9	53
24=	24	29,9805	0,0056	2-Ethyl-3-methoxypyrazine	33244	025680-58-4	59
25=	25	30,3334	0,0365	3-Methoxy-2-methylphenol \$Phenol, 3-methoxy-2-methyl- \$o-Cresol, 3-metho	33416	006971-52-4	43
26=	26	30,5612	0,0061	1,4-Benzenediol, 2,6-dimethyl- \$m-Xylene-2,5-diol \$m-Xylohydroquinone \$m	33612	000654-42-2	50
27=	27	30,9711	0,0169	9-Borabicyclo[3.3.1]nonane, 9-(1,1-dimethylethoxy)-	106650	080095-75-6	50
28=	28	31,1533	0,0233	9-Borabicyclo[3.3.1]nonane, 9-(1-methylpropoxy)-	106651	094537-52-7	59
29=	29	31,3203	0,0042	1,4-Benzenediol, 2,6-dimethyl- \$m-Xylene-2,5-diol \$m-Xylohydroquinone \$m	33611	000654-42-2	52
30=	30	31,6012	0,0122	3,5-Dimethylbenzyl fluoride	33752	136822-77-0	49
31=	31	32,3831	0,0541	3-Methoxybenzyl alcohol \$m-Methoxybenzyl alcohol \$Benzenemethanol, 3-me	33554	006971-51-3	58
32=	32	33,3168	0,0349	3,5-Dimethylbenzyl fluoride	33752	136822-77-0	52
33=	33	33,5787	0,0139	Benzene, 1-methyl-4-(methylthio)- (CAS) \$4-METHYL-THIOANISOLE \$4-METHYL-	33665	000623-13-2	43
34=	34	33,943	0,0503	1(2H)-Acenaphthylenone, 2-diazo- \$1-Acenaphthenone, 2-diazo- \$.alpha.-Diazo	106076	002008-77-7	50
35=	35	34,3492	0,0046	1,4-Benzenediol, 2,6-dimethyl- \$m-Xylene-2,5-diol \$m-Xylohydroquinone \$m	33611	000654-42-2	45
36=	36	34,5466	0,008	Phenol, 3-methoxy-2-methyl-	33414	006971-52-4	50
37=	37	42,0049	1,6595	1,3-Benzenediol, 5-pentyl-	86520	000500-66-3	93
38=	38	43,2536	0,0796	1,3-Benzenediol, 5-pentyl-	86520	000500-66-3	74
39=	39	43,6484	0,005	1,3-Benzenediol, 5-pentyl-	86520	000500-66-3	72
40=	40	43,7205	0,004	1,3-Benzenediol, 5-pentyl-	86520	000500-66-3	64
41=	41	47,3149	0,1547	HAPTO-3-ALLYL-HAPTO-5-CYCLOPENTADIENYL-METHYL-COBALT	85974	000000-00-0	35
42=	42	49,448	0,0458	cis-4b,5 9b,10-tetrahydro-8-methoxy-5-methylindeno[1,2-b]indole	188579	000000-00-0	37
43=	43	52,6818	0,0083	2-METHOXY-5-METHYL PYRAZINE	20783	000000-00-0	35
44=	44	54,4847	0,0236	Methanimidamide, N,N-dimethyl-N'-[3-[[[(methylamino)carbonyl]oxy]phenyl]- \$	145760	022259-30-9	9
45=	45	58,2841	0,0125	1H-Purin-6-amine, [(2-fluorophenyl)methyl]- (CAS)	177443	074421-44-6	38
46=	46	60,2161	0,0237	benzyl n-hyxl sulfide	127592	034005-03-3	27
47=	47	62,5124	0,1538	Formylmethylenetriphenylphosphorane	254583	028900-91-6	90

[contents]							
count=1							
Name=	D:\MSDCHEM\DATA\2015\ACEITES\NATHALY ANDRADE\B5MS_1\12_2_D						
1=	PBM Apex						
[PBM Apex]							
Time=	Thu Sep 17 12:26:53 2015						
Header=	PK	RT	Area Pct	Library/ID	Ref	CAS	Qual
1=	1	5,5445	0,0088	2-Butene, 2,3-dimethyl- (CAS) \$ 2,3-Dimethyl-2-butene \$ Tetramethylethylene \$ 2,3-Dimethyl-2-butene	3509	000563-79-1	9
2=	2	5,7001	0,0046	.DELTA.3-Carene \$ Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl- (CAS) \$ (+)-3-CARENE \$.DELTA.3-Carene	32249	013466-78-9	72
3=	3	5,8557	3,1201	.alpha.-Thujene \$ Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)- (CAS) \$ Origanene	32142	002867-05-2	94
4=	4	6,0835	8,9334	(1S)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene \$ 1S-.alpha.-Pinene \$ (-)-.alpha.-Pinene \$ L-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene	32415	007785-26-4	96
5=	5	6,5238	0,0202	isopentyl chloroacetate \$ Chloroacetic acid, 3-methylbutyl ester \$ Acetic acid, chloro-, 3-methyl-	63936	005326-92-1	23
6=	6	6,63	0,0833	Camphene \$ Bicyclo[2.2.1]heptane, 2,2-dimethyl-3-methylene- \$ 2,2-Dimethyl-3-methylenebicyclo[2.2.1]heptane	32116	000079-92-5	96
7=	7	6,7629	0,0071	Methane, dichloro- (CAS) \$ Dichloromethane \$ R 30 \$ Freon 30 \$ Narkotil \$ Solaesthin \$	3071	000075-09-2	7
8=	8	7,5144	2,9479	Sabinene \$ Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1-(1-methylethyl)- (CAS) \$ 4(10)-Thujene \$	32166	003387-41-5	97
9=	9	7,6548	1,6257	2-.BETA.-PINENE \$ Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene- (CAS) \$.beta.-Pinene	32213	000127-91-3	96
10=	10	8,2584	0,7739	.beta.-Myrcene \$ 1,6-Octadiene, 7-methyl-3-methylene- (CAS) \$ 2-Methyl-6-methylene-2-octene	31858	000123-35-3	94
11=	11	8,5886	0,0312	2-.BETA.-PINENE \$ Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene- (CAS) \$.beta.-Pinene	32216	000127-91-3	90
12=	12	8,8846	28,9872	l-Phellandrene \$ 1,3-Cyclohexadiene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)- (CAS) \$ p-Mentha-1,5-diene	31925	000099-83-2	94
13=	13	9,2983	0,3409	.gamma.-Terpinene \$ 1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)- (CAS) \$ 1-ISOPROPYL-4-METHYLETHYLENE	31961	000099-85-4	95
14=	14	9,6589	0,5642	Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)- (CAS) \$ 1-Methyl-2-isopropylbenzene \$ o-Cymene	29872	000527-84-4	97
15=	15	9,8639	35,6618	l-Limonene \$ Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-, (S)- (CAS) \$ (-)-Limonene \$	32008	005989-54-8	98
16=	16	10,2624	0,5364	.DELTA.3-Carene \$ Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl- (CAS) \$ (+)-3-CARENE \$.DELTA.3-Carene	32247	013466-78-9	91
17=	17	11,0823	0,5678	.gamma.-Terpinene \$ 1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)- (CAS) \$ 1-ISOPROPYL-4-METHYLETHYLENE	31960	000099-85-4	98
18=	18	12,2741	15,0776	.ALPHA.-TERPINOLENE \$ Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)- (CAS) \$ 1,4(8)-P-MENTH-1-ENE	32030	000586-62-9	98
19=	19	12,9611	0,0512	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)- (CAS) \$.BETA. OCIMENE Y \$ trans-.beta.-Ocimene \$	31804	003779-61-1	89
20=	20	13,1736	0,0353	3-Carene \$ Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl- \$.delta.(Sup3)-Carene \$ 3,7,7-Trimethyl-3-carene	32238	013466-78-9	94
21=	21	13,4849	0,0039	Ocimene \$ Octane, 2,6-dimethyl-, hexadecahydro deriv. \$ Octatriene, dimethyl- \$ Dimethyl-3-carene	32377	029714-87-2	87
22=	22	13,5494	0,0027	3-Carene \$ Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl- \$.delta.(Sup3)-Carene \$ 3,7,7-Trimethyl-3-carene	32238	013466-78-9	90
23=	23	13,6253	0,0015	.gamma.-Terpinene \$ 1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)- (CAS) \$ 1-ISOPROPYL-4-METHYLETHYLENE	31957	000099-85-4	86
24=	24	14,4489	0,004	3-Carene \$ Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl- \$.delta.(Sup3)-Carene \$ 3,7,7-Trimethyl-3-carene	32238	013466-78-9	49
25=	25	14,5628	0,0035	3-Carene \$ Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl- \$.delta.(Sup3)-Carene \$ 3,7,7-Trimethyl-3-carene	32238	013466-78-9	86
26=	26	14,7032	0,0029	.DELTA.3-Carene \$ Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl- (CAS) \$ (+)-3-CARENE \$.DELTA.3-Carene	32244	013466-78-9	64
27=	27	14,9765	0,0104	1,3-dimethylene-2-methylcyclopentane	11622	000000-00-0	49
28=	28	15,785	0,0032	Cyclobutane, methylene- (CAS) \$ Methylene-cyclobutane	1158	001120-56-5	10
29=	29	16,5099	0,0011	(-)-Caryophyllene oxide \$ (-)-5-Oxatricyclo[8.2.0.0(4,6)]dodecane, 12-trimethyl-9-methylene-	145064	001139-30-6	25
30=	30	16,7452	0,0561	(r-1,c-4)-p-menth-8-en-1-ol	53524	000000-00-0	47
31=	31	17,1893	0,0045	.gamma.-Terpinene \$ 1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)- (CAS) \$ 1-ISOPROPYL-4-METHYLETHYLENE	31955	000099-85-4	59
32=	32	18,2103	0,0026	1,2-Propadiene (CAS) \$ Allene \$ Propadiene \$ sym-Allylene \$ Propa-1,2-diene \$ Dimethyl-1,2-propadiene	139	000463-49-0	5
33=	33	18,347	0,0025	cis-Ocimene \$ 1,3,7-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)- (CAS) \$ trans-.alpha.-Ocimene	31828	006874-10-8	40
34=	34	18,4722	0,0004	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (Z)- (CAS) \$ cis-3,7-Dimethyl-1,3,6-octatriene \$.BETA. OCIMENE	31801	003338-55-4	50
35=	35	23,2357	0,0082	.alpha.-Terpinene \$ 1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)- (CAS) \$ 1,3-P-MENTH-1-ENE	31911	000099-86-5	80
36=	36	23,3875	0,1115	.ALPHA.-TERPINOLENE \$ Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)- (CAS) \$ 1,4(8)-P-MENTH-1-ENE	32042	000586-62-9	93
37=	37	25,0424	0,0146	.alpha.-Copaene \$ Tricyclo[4.4.0.0(2,7)]dec-3-ene, 1,3-dimethyl-8-(1-methylethyl)-, stereoisomer	121683	003856-25-5	72
38=	38	26,8149	0,0277	Cyclohexane, 1,5-diethenyl-3-methyl-2-methylene-, (1.alpha.,3.alpha.,5.alpha.)-	62824	074742-35-1	35
39=	39	29,3731	0,3401	GERMACRENE-D	121788	023986-74-5	98
40=	40	29,7071	0,0059	valencene 2	121516	004630-07-3	74
41=	41	30,3372	0,0031	(2-Norborneno)[c]furan \$ 4,7-Methanoisobenzofuran, 4,5,6,7-tetrahydro- (CAS)	29634	071065-24-2	4
42=	42	31,1647	0,0056	Bicyclo[2.2.1]hept-2-ene, 1,7,7-trimethyl- \$ 2-Bornene \$ Bornylene \$ 1,7,7-Trimethyl-2-borneol	32103	000464-17-5	72
43=	43	32,402	0,0055	1H-Imidazole, 4-(2-propenyl)- (CAS) \$ 4-Allylimidazole	11151	050995-98-7	47

ANEXO VII

INDICE DE KOVATS

Obtenido los cromatogramas se procedió a calcular mediante la ecuación 1 los índices de Kovats (IK) de los picos integrados, para ello se comparó el tiempo retención de los hidrocarburos con el tiempo de retención de los componentes del aceite esencial aplicando la siguiente formula:

$$IK = 100n + 100 * \frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \quad (1)$$

Dónde:

IK: Índice de retención de Kovats

n: Número de átomos de carbono en 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 de n-alcano que eluye después del compuesto analizado.

La identificación de los compuestos se llevó a cabo en base a los índices de Kovats (IK) determinados experimentalmente en las corridas cromatográficas tanto en la columna polar como no polar, valores que se compararon con los reportados por Adams (Adams, 2009), bases de datos electrónicas como Nist (National Institute of Standards and Technology) y en artículos de revistas como Flavour and Fragrance; de modo que la diferencia entre el IK calculado y el leído debe ser menor a 20 unidades.