



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO

Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.) de la provincia de Zamora Chinchipe

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Coronel López, Edgar Andrés.

DIRECTOR: Valarezo Valdez, Benito Eduardo, Ph.D.

LOJA – ECUADOR

2017



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, 2017

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Doctor

Benito Eduardo Valarezo Valdez

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

CERTIFICA:

El presente trabajo de titulación denominado “Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.) de la provincia de Zamora Chinchipe”, realizado por Edgar Andrés Coronel López, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, marzo de 2017

f) _____

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Edgar Andrés Coronel López declaro ser autor del presente trabajo de titulación: “Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.) de la provincia de Zamora Chinchipe”, de la Titulación de ingeniería química, siendo PhD. 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 mi exclusiva responsabilidad.

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

f) _____

Edgar Andrés Coronel López

1105691727

DEDICATORIA

El presente Trabajo de Investigación lo dedico de manera especial a Julio Edgar Coronel Puchaicela y Paulina Alexandra López Quishpe, por ser el pilar fundamental de mi esfuerzo y perseverancia durante este tiempo, ya que sin ellos jamás hubiese podido seguir adelante en mis estudios. Hoy sólo quiero decirles con todo el amor y respeto que son los seres que más admiro y que es un orgullo ser su hijo.

A mis hermanos Sheila y Nicolás por estar en los buenos y sobretodo en los malos momentos de mi vida llenándome de sonrisas y corajes pero siempre junto a mí para ellos siempre mi amor sincero.

A Dios, ya que gracias a él tengo esos padres maravillosos, los cuales me apoyan en mis fracasos y triunfos y por haberme permitido llegar hasta este punto dándome salud para lograr mis metas.

Con Cariño Edgar Coronel.

AGRADECIMIENTO

A Dios, quien medio la vida y me ha acompañado durante mis estudios, dándome inteligencia y salud.

A mi familia por mantenerse a mi lado brindándome su apoyo, cariño y comprensión durante todo este tiempo ya que sin ellos habría sido imposible seguir con mis estudios.

A mis abuelitas, que son parte esencial del compromiso para realizar mis estudios.
A mis hermanos por haber estado junto a mí en las dificultades que encontramos en el camino.

Son muchos los amigos que estuvieron 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.

Agradezco de manera especial a mi director de Tesis Ph.D Eduardo Valarezo por transmitir sus conocimientos, por orientarme, por su ayuda y motivación brindada para realizar este proyecto; una gran persona que con su ayuda me ayudado en mi formación integral, un excelente profesor y para él mi admiración y respeto.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARATULA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO I	
1.1. Aceites esenciales.....	6
1.1.1. Extracción.....	6
1.1.2. Clasificación.....	7
1.1.3. Caracterización.....	8
1.1.3.1. Cromatografía de gases.....	9
1.1.3.1.1. Cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas.....	10
1.1.3.1.2. Cromatografía de gases acoplado a detector de ionización de llama.....	10
1.1.4. Propiedades de los aceites esenciales.....	11
1.1.4.1. Propiedad antimicrobiana.....	11
1.1.4.2. Propiedad expectorante.....	11
1.1.4.3. Propiedad Antiinflamatoria.....	12
1.1.5. Usos y aplicaciones.....	12
1.2. Actividad Biológica.....	12
1.2.1. Bacterias.....	13
1.2.1.1. Bacterias gram positivas.....	14
1.2.1.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	14
1.2.1.1.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	15
1.2.1.2. Bacterias gram negativas.....	15
1.2.1.2.1. <i>Escherichia coli</i>	16
1.2.1.2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	17
1.2.1.2.3. <i>Pseudomona aeruginosa</i>	17
1.2.1.2.4. <i>Proteus vulgaris</i>	18

1.2.1.2.5. <i>Salmonella typhimurium</i>	19
1.2.2. Actividad Antioxidante.....	19
1.2.2.1. Método ABTS (2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).....	20
1.2.2.2. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).....	21
1.3. Plantas medicinales.....	21
1.4. Flora Ecuatoriana.....	22
1.4.1. Flora aromática del Ecuador.....	23
1.5. La Familia Piperaceae.....	23
1.5.1. El género Piper.....	24
1.5.1.1. <i>Piper carpunya</i> Ruiz & Pav.....	25
CAPITULO II	
2.1. Metodología.....	27
2.1.1. Recolección del material vegetal.....	28
2.1.2. Extracción del aceite esencial.....	29
2.1.3. Determinación de las propiedades físicas.....	30
2.1.3.1. Determinación de la humedad de la planta.....	30
2.1.3.2. Determinación del rendimiento en aceite esencial.....	30
2.1.3.3. Densidad relativa del aceite esencial.....	31
2.1.3.4. Índice de refracción del aceite esencial.....	32
2.1.3.5. Actividad óptica del aceite esencial.....	33
2.1.4. Determinación de la composición química del aceite esencial.....	34
2.1.4.1. Cromatografía de gases.....	34
2.1.4.1.1. Preparación de la muestra.....	34
2.1.4.1.2. Análisis del aceite esencial en CG-MS y CG-FID.....	35
2.1.4.1.3. Corrida cromatográfica en la columna DB5-MS acoplada a espectrometría de masas.....	36
2.1.4.1.4. Corrida cromatográfica en la columna HP-INNOWAX acoplada a espectrometría de masas.....	37
2.1.4.1.5. Identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos químicos del aceite esencial de <i>P. carpunya</i>	38
2.1.4.1.6. Corrida cromatográfica en la columna no polar DB5-MS, acoplada al detector de ionización de llama (FID).....	39

2.1.4.1.7. Corrida cromatográfica en la columna polar HP-INNOWAX, acoplada al detector de ionización de llama (FID).....	40
2.1.4.1.8. Cuantificación de los compuestos identificados mediante cromatografía de gases acoplada al detector de ionización de llama (FID), en ambas columnas polar y no polar.....	42
2.1.5. Determinación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>P. carpunya</i>	42
2.1.5.1. Determinación de la actividad biológica del aceite esencial de <i>P. carpunya</i>	42
2.1.5.2. Prueba utilizada para evaluar la actividad antibacteriana.....	43
2.1.5.2.1. Método micro dilución en caldo.....	43
2.1.5.2.2. Preparación de la muestra del aceite esencial.....	44
2.1.5.2.3. Preparación del cultivo bacteriano “Cultivo Overnight”.....	44
2.1.5.2.4. Preparación de la suspensión del inóculo bacteriano.....	45
2.1.5.2.5. Procedimiento.....	45
2.1.5.2.6. Lectura de las placas de concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana e interpretación de los resultados.....	46
2.1.6. Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de las hojas de <i>P. carpunya</i>	47
2.1.6.1. Preparación de la muestra de aceite esencial de <i>P. carpunya</i>	48
2.1.6.2. Método capacidad de atrapamiento del catión – radical ABTS+.....	49
2.1.6.2.1. Solución patrón y de trabajo de ABTS+.....	49
2.1.6.2.2. Estándar Trolox para ABTS+.....	50
2.1.6.2.3. Lectura de muestras.....	51
2.1.6.3. Método radical DPPH.....	51
2.1.6.3.1. Solución patrón y de trabajo para DPPH.....	52
2.1.6.3.2. Estándar Trolox y BHT para DPPH.....	52
2.1.6.3.3. Lectura de las muestras.....	52
2.1.6.4. Análisis de los datos obtenidos mediante ABTS+ y DPPH.....	53
CAPITULO III.....	55
3.1. Humedad.....	56
3.2. Rendimiento.....	57
3.3. Propiedades físicas.....	58

3.3.1. Densidad relativa.....	58
3.3.2. Índice de refracción.....	59
3.3.3. Actividad Óptica específica.....	60
3.4. Composición Química.....	60
3.4.1. Análisis cualitativo y cuantitativo.....	60
3.5. Actividad Biológica del aceite esencial de <i>P. carpunya</i>	67
3.5.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana.....	68
3.6. Actividad Antioxidante del aceite esencial de <i>P. carpunya</i>	70
3.6.1. Método ABTS+.....	70
3.6.1.1. Lectura de los estándares TROLOX/BHT.....	70
3.6.1.2. Lectura de las muestras de aceite esencial.....	71
3.6.2. Método DPPH.....	72
3.6.2.1. Lectura de los estándares TROLOX/BHT.....	72
3.6.1.2. Lectura de las muestras de aceite esencial.....	72
CONCLUSIONES.....	75
RECOMENDACIONES.....	76
BIBLIOGRAFIA.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Staphylococcus aureus</i>	14
Figura 2. <i>Enterococcus faecalis</i>	15
Figura 3. <i>Escherichia coli</i>	16
Figura 4. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	17
Figura 5. <i>Pseudomona aeruginosa</i>	17
Figura 6. <i>Proteus vulgaris</i>	18
Figura 7. <i>Salmonella tiphymurium</i>	19
Figura 8. Muestra botánica de <i>P. carpunya</i>	25
Figura 9. Esquema metodológico del desarrollo de la investigación.....	27
Figura 10. Mapa de recolección de la especie <i>P. carpunya</i>	28
Figura 11. Equipo de destilación.....	29
Figura 12. Recolección del aceite extraído.....	31
Figura13. Etiquetado y almacenamiento.....	31
Figura 14. Picnómetro 1ml con aceite.....	32
Figura 15. Balanza analítica.....	32
Figura 16. Refractómetro ABBE.....	32
Figura 17. Polarímetro digital.....	33
Figura 18. Celda del polarímetro.....	33
Figura 19. Cromatógrafo de gases.....	34
Figura 20. Viales listos para inyección.....	35
Figura 21. Cromatógrafo de gases agilent serie 6890n, acoplada a un espectrómetro de masas agilent serie 5973 inert.....	35
Figura 22. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna no polar DB-5MS.....	37
Figura 23. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna polar HP-INNOWAX.....	38
Figura 24. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna no polar DB-5MS acoplada a un detector de ionización de llama (FID). 40	40
Figura 25. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna polar HP-INNOWAX acoplada a un detector de ionización de llama (FID).....	41

Figura 26. Modelo de microplaca IC96 para bacterias con las concentraciones de aceite ($\mu\text{g/ml}$).....	46
Figura 27. Micro placa previa a la lectura de la cmi antibacterial.....	47
Figura 28. Espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS SCANNING 333907.....	48
Figura 29. Muestras del aceite esencial de <i>P. carpunya</i> , analizadas mediante el método ABTS ⁺	51
Figura 30. Muestras del aceite esencial de <i>P. carpunya</i> , analizadas mediante el método DPPH.....	53
Figura 31. Perfil cromatográfico del aceite esencial de <i>P. carpunya</i> en la columna no polar DB- 5MS.....	61
Figura 32. Perfil cromatográfico del aceite esencial de <i>P. carpunya</i> en la columna polar HP-INNOWAX.....	62
Figura 33. Compuestos mayoritarios en la columna no polar DB5-MS.....	64
Figura 34. Compuestos mayoritarios en la columna polar HP-INNOWAX.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos de prueba.....	43
Tabla 2. Medios de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada bacteria.....	44
Tabla 3. Dilución de aceite esencial para actividad antioxidante.....	49
Tabla 4. Volumen necesario para cada dilución de BHT y Trolox.....	50
Tabla 5. Porcentajes de humedad de la materia vegetal.....	56
Tabla 6. Porcentajes de rendimiento de la materia vegetal.....	57
Tabla 7. Densidad relativa del aceite esencial de <i>P. carpunya</i>	58
Tabla 8. Índice de refracción del aceite esencial de <i>P. carpunya</i>	59
Tabla 9. Actividad óptica del aceite esencial de <i>P. carpunya</i>	60
Tabla 10. Composición química del aceite esencial de <i>P. carpunya</i>	63
Tabla 11. Composición química del aceite esencial de <i>P. carpunya</i>	66
Tabla 12. CMI antibacteriana del aceite esencial frente a 7 cepas bacterianas.....	68
Tabla 13. Datos del método ABTS ⁺ para los estándares BHT y Trolox.....	70
Tabla 14. Datos del método ABTS ⁺ para el aceite esencial de <i>P. carpunya</i>	71
Tabla 15. Datos del método DPPH para los estándares BHT y Trolox.....	72
Tabla 16. Datos del método DPPH para el aceite esencial de <i>P. carpunya</i>	73

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Determinación de humedad relativa.....	86
Anexo 2. Determinación del porcentaje de rendimiento.....	87
Anexo 3. Determinación de la densidad relativa a 20°C.....	88
Anexo 4. Determinación del índice de refracción.....	91
Anexo 5. Determinación de la actividad óptica.....	93
Anexo 6. Referencias bibliográficas índice de retención de kovats aritmético.....	97

RESUMEN

Piper carpunya (Ruiz & Pav.) es un arbusto que crece en las riveras de las vertientes de la provincia de Zamora Chinchipe, el aceite esencial de sus partes aéreas fue extraído por hidrodestilación. La composición química del aceite esencial se determinó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas CG/ES y al detector de ionización de llama CG/FID. La actividad antimicrobiana fue evaluada por el método de micro dilución en caldo y la actividad antioxidante por el método de ABTS⁺ y DPPH. También se determinaron las propiedades físicas del aceite. Se identificaron 27 compuestos que representan el 99,1% del aceite. Los componentes mayoritarios fueron 1,8-Cineole (26,1%); Safrole (23,6%); Germacrene-D (6,7%); α - Terpinene (6,2%); la densidad del aceite de 0,9231 g/cm³, índice de refracción fue de 1,4877 y una actividad óptica de +3,5°; además el aceite no mostro actividad antibacteriana ni antioxidante en las concentraciones evaluadas.

PALABRAS CLAVES: *Piper carpunya*, Aceite esencial, Cineole, Actividad biológica, Actividad antioxidante.

ABSTRACT

Piper carpunya (Ruiz & Pav.) is a shrub that grows next to slope in the province of Zamora Chinchipe, the essential oil of its leaves was extracted by hydro distillation. The chemical composition of the essential oil was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry CG/MS and the flame ionization detector CG / FID. The antimicrobial activity was evaluated by the micro dilution method in broth and the antioxidant activity by the ABTS + and DPPH method. The physical properties of the oil were also determined. 27 compounds representing 99.1% of the oil were identified. The major components were 1,8-Cineole (26.1%); Safrole (23.6%); Germacrene-D (6.7%); A-Terpinene (6.2%); The oil density of 0.923 g / cm³, refractive index was 1.4877 and an optical activity of + 3.549 °; in addition the oil didn't show us antibacterial or antioxidant activity about the evaluated concentrations.

KEYWORDS: *Piper carpunya*, Essential oil, Cineol, Biological activity, Antioxidant activity.

INTRODUCCIÓN

El presente estudio consiste en la determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Piper Carpunya* de la provincia de Zamora. Se desarrolla en 3 capítulos, el primer capítulo titulado Marco Teórico trata sobre el estado del arte del tema, en el segundo capítulo se da a conocer las técnicas y los materiales 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 y específicamente al proyecto “Evaluación de la flora aromática de la Provincia Zamora Chinchipe” que se desarrolla en la Sección de Ingeniería de Procesos de la Universidad Técnica de Loja. Con este estudio se aumenta el conocimiento sobre la existencia de los aceites esenciales, sus propiedades y usos para aplicaciones en las diferentes industrias tales como: farmacéutica, cosmética y alimenticia, alimentando la información en el Catálogo de Plantas Aromáticas de la UTPL. Una vez conocida la composición química, propiedades físicas y actividad biológica de los aceites esenciales de la región del sur del Ecuador, los mismos pueden ser usados como materia prima para las diferentes industrias o para la formulación de subproductos.

El objetivo general es desarrollar el estudio de aceites esenciales provenientes de especies vegetales, y determinar los componentes químicos y las propiedades físicas presentes en la especie en estudio así como también determinar la actividad biológica y los objetivos específicos, también considerados como componentes del proyecto: Extracción del aceite esencial de *Piper carpunya* y cálculo del rendimiento real; determinar las propiedades físicas y composición química las cuales nos permitirán establecer condiciones de uso, así como también determinar los compuestos mayoritarios y su importancia a nivel industrial; determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para determinar la actividad biológica del aceite esencial de *P. carpunya* y el de contribuir al desarrollo de nuevos estudios sobre *P. carpunya* fueron desarrollados en su totalidad. Para lo cual se inició con la recolección del material vegetal, al cual luego de un tratamiento post cosecha se le extrajo el aceite esencial mediante arrastre con vapor, al aceite obtenido se le determinó la densidad relativa según la norma AFNOR NF T75-111 (ISO 279:1998), el índice de refracción mediante la norma AFNOR NF 75-112 (ISO 280:1998), la composición química utilizando cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas CG/ES y acoplada un detector de Ionización de llama CG/FID, La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada por el método de microdilución en caldo usando una concentración de 5×10^5

UFC/mL para bacterias Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC9997), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2) y bacterias Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), y la actividad antioxidante mediante dos métodos espectrofotométricos midiendo la capacidad de atrapamiento del catión-radical ABTS⁺ y del radical DPPH, para así aportar con nuevos estudios al avance de la medicina natural.

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

1.1 Aceites esenciales

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos dentro de las familias de plantas que incluyen Piperaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Pinaceae, Rosaceae, Rutaceae, entre otras (Elechosa, 2009). Se les puede encontrar en diferentes partes de la planta como: en las hojas (ajenjo, albahaca, cedrón, eucalipto, hierbabuena, limoncillo, menta, romero, toronjil, etc.), en las raíces (angélica, azafrán, cálamo, jengibre, sándalo, valeriana, etc.), en el pericarpio del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.), en las semillas (anís, eneldo, hinojo, comino, etc.), en el tallo (canela, alcanfor, etc.), en las flores (lavanda, manzanilla, tomillo, clavo de olor, rosa, etc.) y en los frutos (cilantro, laurel, nuez moscada, perejil, pimienta, etc.) (Dudareva and Pichersky 2006).

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios sintetizados en las plantas con roles de defensa o como atrayentes de polinizadores entre otras funciones en los vegetales a reacciones ecológicas y/o atmosféricas (Rodríguez-Álvarez, Alcaráz-Meléndez, & Real-Cosío, 2012). Los mismos son porciones líquidas volátiles, habitualmente extraídos por arrastre con vapor de agua, en el proceso de destilación, contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética, de alimentos y farmacéutica (Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008).

Los aceites esenciales son mezclas químicas orgánicas complejas de más de 100 componentes que pueden corresponder a compuestos alifáticos de bajo peso molecular como: alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos; monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos. Aunque la gran mayoría tienen olores agradables existen esencias que por la presencia a compuestos azufrados son desagradables como lo son las esencias de ajo y cebolla (Martinez, 2001).

1.1.1 Extracción.

Los métodos de extracción de aceites esenciales de muestras vegetales son diversos algunos de los más utilizados son: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, enfleurage y con fluidos supercríticos. Según la variedad del material vegetal, parte de la planta a emplear y estabilidad del aceite esencial que se pretenda

obtener, se emplean diversos procedimientos físicos y químicos de extracción, donde su correcta aplicación será lo que determine la calidad del producto final. Sin embargo, en materia de rendimiento es importante establecer que ninguna cantidad de mejoras en los aspectos tecnológicos compensará la mala calidad del material vegetal. Dependiendo de las variables anteriores, se tienen diversas técnicas de extracción. Que incluyen métodos directos, de destilación y de extracción con solventes. Donde los métodos más utilizados son los métodos de destilación por su gran diversificación y su fácil operatividad (Angulo-Flórez, Cardona, Lozano-Calderón, Montañez-Pinzón, & Salcedo-Osorio, 2014).

El método de destilación con vapor de agua también llamado por arrastre de vapor, hidrodifusión, hidrodestilación o hidroextracción, es el más utilizado especialmente para esencias fluidas, utilizadas para perfumería. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada (Rodríguez-Álvarez et al., 2012).

El proceso de destilación por arrastre de vapor por agua, consiste en cargar materia prima normalmente fresca que es cargada en un equipo especializado para realizar de forma que la carga forme un lecho fijo compactado, la misma que es sometida al flujo constante de una corriente de vapor de agua saturado o sobrecalentado (Rodríguez-Álvarez et al., 2012). El vapor aporta con determinada temperatura que produce la ruptura del tejido vegetal liberando el aceite esencial. Dicho aceite queda atrapado entre las gotas de vapor de agua que pasarán posteriormente a un intercambiador de calor para el cambio de fase (Bandoni, 2002).

El intercambiador de calor es un condensador en cuya salida, se obtiene una emulsión líquida inestable, que es recolectado en un decantador dinámico o florentino. El proceso llega a su fin cuando el volumen del aceite acumulado en el florentino no varíe con el tiempo de extracción (Rodríguez-Álvarez et al., 2012).

1.1.2 Clasificación.

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

De acuerdo con la consistencia:

- Esencias fluidas que corresponden a los aceites que son líquidos volátiles a temperatura ambiente
- Bálsamos son aceites cuyas consistencias son más espesas y poco volátiles pero que tiene una ligera tendencia a sufrir reacciones de polimerización.
- Oleorresinas mantienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas.

Considerando su origen se los puede clasificar como:

- Naturales que son obtenidos directamente de una fuente vegetal sin hacerle ningún tipo de modificación, debido a su bajo rendimiento son considerados los de costos más altos.
- Artificiales que son obtenidos por mezclas y enriquecimientos de componentes de los mismos tipos de esencias.
- Sintéticos que son producidos por la combinación de sus componentes químicos la mayoría producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y más comercializados como aromatizantes y en otros casos como saborizantes.

1.1.3 Caracterización.

La caracterización de un aceite corresponde a la serie de procedimientos de diferenciación de características que nos permiten distinguir de forma cualitativa y cuantitativa una especie de otra. Los métodos de caracterización de aceites esenciales pueden ser físicos y químicos, siendo el método de cromatografía el más utilizado por su elevado grado de eficiencia en la diferenciación de los componentes integrales (Molares, González, Ladio, & Castro, 2009).

La cromatografía es una técnica muy utilizada en diferentes áreas de la ciencia, pues permite la separación de los distintos componentes de una mezcla gracias a dos efectos contrarios que gobiernan esta técnica (Gutiérrez Bouzán & Droguet, 2002).

La retención: es el efecto que se ejerce sobre los componentes de una mezcla por medio de una fase estacionaria, la cual puede ser de naturaleza sólida o un líquido que se encuentre anclado en un soporte sólido (Stashenko & Martínez, 2010).

Desplazamiento: Es el efecto que se ejerce sobre los componentes de una mezcla por la fase móvil, la cual puede ser de naturaleza líquida o gaseosa (Harris, 2006).

Para realizar la cromatografía, la mezcla que se desea separar se coloca sobre la fase estacionaria, y la fase móvil atravesará el sistema arrastrando y desplazando a los distintos componentes a distintas velocidades, esto dependerá de la magnitud de las interacciones relativas con ambas fases (Douglas Arvid Skoog et al., 2008).

1.1.3.1 Cromatografía de gases.

La cromatografía de gases es una práctica de laboratorio que tiene una finalidad separativa, tiene la característica de conseguir la separación de composiciones muy complejas. Sin embargo una vez aislados, revelados, e incluso ponderados todos los componentes individuales de una muestra, el dato relevante del que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención que corresponde a los picos cromatográficos. No obstante este dato no es suficiente para una identificación infalible, sobre todo cuando analizamos muestras con un número elevado de componentes, como es el caso de los aceites esenciales (Gutiérrez Bouzán & Droguet, 2002).

La cromatografía de gases consiste en pasar una fase móvil que corresponde a la muestra constituida por una mezcla que contiene el compuesto deseado en el solvente que es generalmente un gas inerte como el helio 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, normalmente corresponde a un líquido no volátil viscoso enlazado químicamente a las paredes interiores de un tubo capilar o a la superficie de las partículas sólidas empaquetadas dentro de la columna (Harris, 2006). La forma que los componentes la atraviesan a diferentes velocidades y se separan en el tiempo son determinados por el reparto de solutos entre la fase móvil y estacionaria. Cada uno de los componentes de la mezcla presenta un tiempo característico de paso por el sistema, denominado tiempo de retención (Gutiérrez Bouzán & Droguet, 2002).

La cromatografía de gases corresponde a una técnica que separa componentes individuales, en las últimas décadas una de las técnicas más recurrentes 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; Stashenko & Martínez, 2010).

1.1.3.1.1 Cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas.

La espectrometría de masas puede identificar casi exactamente cualquier sustancia pura, sin embargo no es capaz de identificar los componentes individuales de una muestra compleja sin separar previamente sus componentes. La asociación de estas dos técnicas, GC (“Gas Chromatography”) y MS (“Mass Spectrometry”) da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas, son técnicas muy afines pues trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis. En la actualidad el acoplamiento directo resulta fácil cuando se utiliza la cromatografía de gases capilar que es la técnica de mayor uso en el análisis de los aceites esenciales (Gutiérrez Bouzán & Droguet, 2002).

1.1.3.1.2 Cromatografía de gases acoplado a detector de ionización de llama.

El detector más ampliamente utilizado en la cromatografía de gases es el FID por sus siglas en inglés (Flame Ionization Detector), debido a su elevada sensibilidad, amplio intervalo de respuesta lineal, poco ruido, robustez y sencillez. Este tipo de detectores se los utiliza regularmente en la columna capilar (Douglas Arvid Skoog et al., 2008). El grado de ionización térmica es directamente proporcional a la cantidad de muestra quemada en la llama. La corriente producida es amplificada y transmitida a un registrador (Arderiu, 1998).

1.1.4 Propiedades de los aceites esenciales.

Las propiedades innatas de los diferentes aceites se deben a la presencia de los diferentes compuestos que los constituyen, sin embargo todos los aceites esenciales presentan ciertas propiedades a diferentes niveles, los cuales darán el uso que tendrá el mismo (Berger, 2007), entre las más representativas se tienen: antimicrobiana, expectorante, espasmolítico, carminativa, colerético y colagoga, antiinflamatoria, analgésica, sedante, anticancerígena, estimulante del sistema nervioso central, etc. Estas actividades manifiestan, total o parcialmente, el uso terapéutico de muchas especies vegetales que presentan aceites esenciales (Cañigüeral & Vila, 2007).

1.1.4.1 Propiedad antimicrobiana.

Los aceites esenciales son usados por sus propiedades antibacterianas frente a microorganismos patógenos y han sido considerados como ingredientes activos en algunos plaguicidas botánicos, debido a su eficacia frente a un número considerable de plagas, su toxicidad mínima en mamíferos y su disponibilidad general (Y. Sánchez, Pino, Correa, Naranjo, & Iglesia, 2009).

Según Thormar (2011) los aceites esenciales que tienen mayor contenido de alcoholes y fenoles presentan una más contundente actividad antimicrobiana, al contrario de los aceites que poseen alcoholes no-fenólicos con óxidos e hidrocarburos, que tienen menor capacidad antimicrobiana.

1.1.4.2 Propiedad expectorante.

Los aceites esenciales tienen esta propiedad debido a la facilidad con la que estimulan el aumento de las secreciones traqueos bronquiales o líquidos del tracto respiratorio (Leyva et al., 2008) para reducir su viscosidad estimulando el reflejo de la tos (Fernández et al., 2009).

1.1.4.3 Propiedad Antiinflamatoria.

Existe una relación muy estrecha entre las plantas que tienen capacidad antioxidante y su actividad antiinflamatoria (García Bacallao, Rojo Domínguez, García Gómez, & Hernández Ángel, 2002). Las sustancias naturales que presentan probada acción antioxidante también se reportan como antiinflamatorias, así existen reportes de la acción antiinflamatoria del 1,8-cineol presente en los aceites esenciales de algunas plantas (Lahlou, Figueiredo, Magalhães, & Leal-Cardoso, 2002).

1.1.5 Usos y aplicaciones.

Dentro de la amplia variedad de extractos de aceites esenciales, se ha identificado más de doscientos con un alto valor comercial que se utilizan ampliamente en diferentes ramas de la industria en determinados procesos o como aditivos para la elaboración de productos terminados entre las más representativas tenemos la industria de alimentos, jabones, ambientadores, perfumes, cosméticos, licores, insecticidas, fármacos, etc (Pavas & Vega, 2012).

La comercialización de los aceites esenciales puros, como productos aromaterápicos ha motivado la búsqueda de nuevos aromas como mayor preferencia las esencias más exóticas y con propiedades seudofarmacológicas. Entre otras innovaciones recientemente planteadas y con un gran potencial de comercialización a futuro son el constituirse como parte de la formulación de biocidas para uso veterinario o agrícola (Rodríguez-Álvarez et al., 2012).

1.2 Actividad Biológica

La capacidad antimicrobiana de algunos aceites esenciales ha sido confirmada por numerosos equipos de investigación. Algunas esencias son activas frente a cierto tipo de bacterias pero no contra hongos, mientras que otras provocan el crecimiento de estos microorganismos. Los aceites esenciales han demostrado capacidad inhibitoria frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, resultando estas últimas más resistentes. Los terpenos que forman parte de los aceites esenciales son los que confieren sus propiedades

inhibitorias frente a las distintas cepas bacterianas y fúngicas (Hernández Díaz & Rodríguez Jorge, 2001).

El consumo de antibacterianos sintéticos que se ha mantenido durante los últimos años que se encuentra en constante declive pues la predisposición actual por parte de los compradores de no adquirir productos con este tipo de compuestos, se ha generado un interés representativo en la investigación de los aceites esenciales como agentes antimicrobianos sustitutos a los compuesto tradicionales. Considerando que una esencia está conformada por una considerable cifra compuestos químicos, lo más acertado es considerar que su acción antibacteriana no sea atribuible a un mecanismo específico, sino a una sinergia entre todos los componentes (Rueda & Mogollón, 2013).

Una característica importante que presentan los aceites esenciales es su hidrofobicidad, lo que les permite adherirse a la membrana de la célula bacteriana, afectando su presión y por consiguiente la hace más permeable ocasionando la fuga de iones presentes al interior de la célula (Bosquez-Molina, Bautista-Baños, & Morales-López, 2009). En síntesis el efecto antimicrobiano que ejerce una esencia se debe a su efecto a nivel de la perturbación de la membrana citoplasmática, la alteración de la fuerza motriz de protones y el flujo de electrones. Los daños a la pared y membrana de la célula ocasionan la fuga de macromoléculas y por consiguiente la lisis (Ramos-García et al., 2010).

1.2.1 Bacterias.

Las bacterias son microorganismos que poseen una amplia distribución en la naturaleza, sus diferencias estructurales tienen implicaciones importantes en la taxonomía, en la clínica y en la terapéutica; son organismos unicelulares con vida independiente y con capacidad de reproducirse se caracterizan por presentar en su estructura dos ácidos nucleicos (Jay et al., 2005; Ruiz & Guillén, 2006).

Las bacterias poseen un tamaño medio que oscila entre 2 y 10 μm . Su citoplasma está repleto de ribosomas, el material genético constituido por ácido desoxirribonucleico (DNA), forma un conglomerado compacto carente de membrana nuclear y una membrana

citoplasmática que confiere la forma a la célula. Las bacterias se clasifican en dos grupos diferentes en función de la estructura de su pared. Un grupo, las denominadas Gram positivas, solo poseen peptidoglicanos; el otro, las denominadas Gram negativas, tienen adosada por fuera del peptidoglicano una membrana rica en polisacáridos (Jay et al., 2005).

1.2.1.1 Bacterias gram positivas.

Bacterias Gram Positivas corresponden al grupo de bacterias que no poseen una membrana externa capaz de proteger el citoplasma bacteriano, que tienen una gruesa capa de peptidoglicano y que presentan ácidos teicoicos en su superficie (Pahissa, 2009). Se distinguen especialmente por teñirse de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram (Díaz Pérez, Rodríguez Martínez, & Zhurbenko, 2010).

1.2.1.1.1 Staphylococcus aureus.

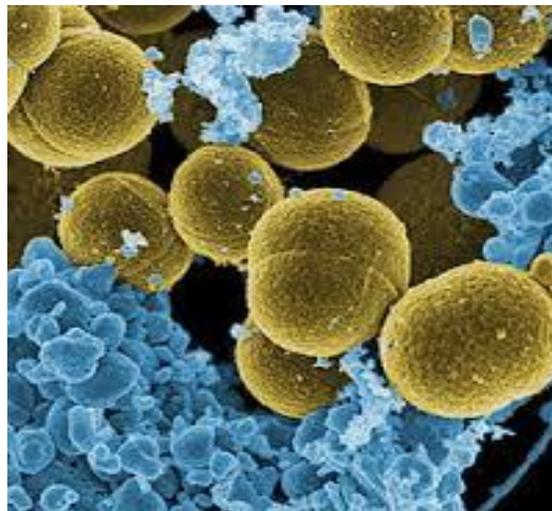


FIGURA 1. *Staphylococcus Aureus*

Fuente: Tortora G; 2007.

Coco inmóvil gram-positivo; tiene un alto grado de patogenicidad y es el responsable de una amplia gama de enfermedades; forma parte de la familia Micrococcaceae, género Staphylococcus. 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 como la neumonía (Bustos-Martínez, Hamdan-Partida, Gutiérrez-Cárdenas, & México, 2006).

1.2.1.1.2 *Enterococcus faecalis*.



FIGURA 2. *Enterococcus faecalis*

Fuente: Tortora G; 2007.

Coco gram positivo, anaerobio facultativo, inmóvil y no esporulado. Pueden encontrarse en el tracto genitourinario y en la saliva. Son caracterizados como patógenos oportunistas para los humanos, pudiendo causar diferentes padecimientos dentro de las que se encuentran las endocarditis, bacteriemias enterocócicas, infecciones del tracto urinario, neonatales, intrabdominal y pélvica (Díaz Pérez et al., 2010).

1.2.1.2 **Bacterias gram negativas.**

Se denominan bacterias Gram negativas a aquellas bacterias que no se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue: de ahí el nombre característico (Romero Cabello, 2007). Presenta doble membrana celular una externa y la otra citoplasmática, lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana.

Son uno de los principales súper grupos de bacterias (Mollinedo Patzi & González Villalobos, 2014).

1.2.1.2.1 *Escherichia coli*.

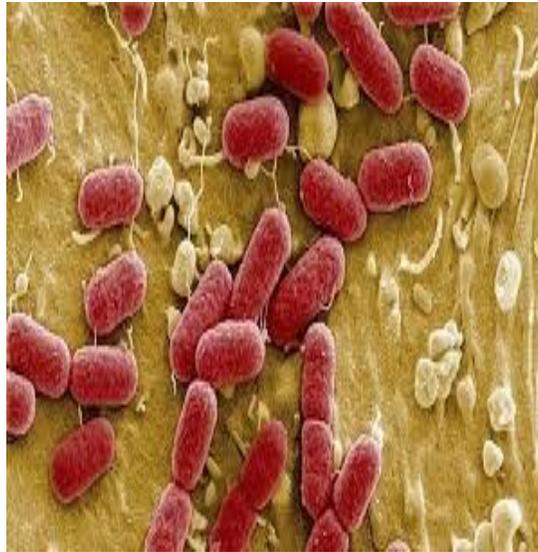


FIGURA 3. *Escherichia coli*

Fuente: Tortora G; 2007.

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae. Este microorganismo coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo normal en la flora bacteria intestinal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos disentería. Cuando se presentan infecciones de importancia clínica suele deberse a *E. coli*, es la causa más frecuente de infección de vías urinarias, diarrea, septicemia y meningitis (Brooks, 2011; Rodríguez-Angeles, 2002).

1.2.1.2.2 *Klebsiella pneumoniae*.



FIGURA 4. *Klebsiella pneumoniae*

Fuente: Tortora G; 2007.

Son bacilos Gram negativos, morfológicamente son capsulas de polisacárido de gran tamaño y falta de motilidad. Está presente en el sistema respiratorio y en las heces de casi el 5% de las personas sanas. Produce una pequeña porción (alrededor de 1%) de las neumonías bacterianas, puede producir una consolidación pulmonar necrosante por hemorragia extensa (Brooks, 2011).

1.2.1.2.3 *Pseudomona aeruginosa*.

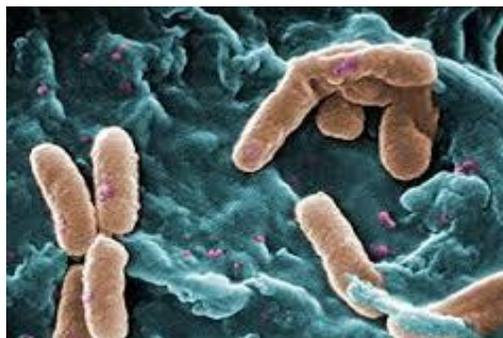


FIGURA 5. *Pseudomona aeruginosa*

Fuente: Tortora G; 2007.

Son bacilos que corresponden al grupo Gram negativos, móviles, tiene forma de bastón. Tiene una amplia distribución en la naturaleza y suele estar presente en medios húmedo. Puede colonizar al ser humano normal en quien es un saprófito(Brooks, 2011). 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).

1.2.1.2.4 *Proteus vulgaris*.



FIGURA 6. *Proteus vulgaris*

Fuente: Tortora G; 2007.

Las bacterias del género *Proteus* producen infecciones en el ser humano solo cuando las bacterias salen del tubo digestivo. Se encuentran presentes en las infecciones urinarias y producen bacteriemia, neumonía y lesiones focales en pacientes débiles o en los que reciben infusiones intravenosas (Brooks, 2011).

1.2.1.2.5 *Salmonella* *tiphymurium*.



FIGURA 7. *Salmonella* *tiphymurium*

Fuente: Tortora G; 2007.

Bacilos móviles, pueden ser nocivas para el ser humano y/o los animales cuando se adquieren por la vía oral. Es causa frecuente de gastroenteritis, además de producir otras infecciones, como por ejemplo bacteriemias en pacientes inmunodeprimidos por el VIH (Brooks, 2011; Gallardo, Soto, Vila, de Anta Losada, & Ruiz, 2003).

1.2.2 Actividad Antioxidante.

Actualmente se ha desarrollado el interés en la investigación de antioxidantes naturales, generalmente conformados por mezclas de variados compuestos con elevada diversidad molecular y funcionalidad biológica (Aruoma, Bahorun, & Jen, 2003). Los antioxidantes son compuestos que inhiben o retardan la oxidación de otras moléculas mediante la inhibición de la iniciación o de la propagación de la oxidación de las reacciones en cadena (Juarez Bernal & Lopez Martinez, 2014; Rosas, 2004).

Los productos naturales de origen vegetal representan una alternativa para usar como antioxidantes, porque poseen una gran diversidad de compuestos como: antocianos, flavonoides, carotenoides, ácido ascórbico entre otros que pueden ser inocuos para la salud

y que además, actúan a bajas concentraciones (Almeida Velasco & Suárez Cedillo, 2014; Parr & Bolwell, 2000). Una gran variedad de antioxidantes son usados en la industria de alimentos por su capacidad conservadora; pues retardan el proceso de rancidez, disminuyen la posibilidad de generación de compuestos tóxicos, evitan la decoloración de los pigmentos, no permiten los cambios en la textura, disminuyen la pérdida de valor nutricional causada por la degradación de los ácidos grasos esenciales y por la destrucción de las vitaminas A, E y D (Cornelli, 2009; Rojano et al., 2008).

Los compuestos fenólicos tienen una gran capacidad antioxidante, actividad biológica responsable del efecto preventivo sobre algunas enfermedades de naturaleza cardiaca e inmunológica. Dentro de esta gran familia pueden encontrarse tres grupos principales: los ácidos fenólicos, los polifenoles y los flavonoides, siendo estos últimos el grupo más común (C. I. Ochoa & Ayala, 2011).

Entre los diversos métodos de análisis de la actividad antioxidante los métodos ABTS (2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo o DPPH), son usados para establecer la capacidad de los compuestos fenólicos y ponderada de captación de los radicales libres generados, operando así en contra los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación, que implican a especies reactivas de oxígeno (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-Filho, & Fett, 2005)

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

El radical ABTS⁺ presenta una absorbancia a una longitud de onda de 734 nm. Esta propiedad da la posibilidad de evitar interferencias generadas por cromógenos del aceite esencial. La absorbancia característica de este radical que posee un color verde azulado, disminuye en presencia de un antioxidante u otro radical. Es posible, por tanto, cuantificar la capacidad captadora de radicales libres que presenten los aceites esenciales mediante la determinación del grado de decoloración que provocan a una solución de ABTS⁺ (Rosas, 2004).

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

DPPH este método se basa en la reducción del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) por los compuestos antioxidantes de la muestra del aceite esencial. El Fundamento del método desarrollado por Brand-Williams, 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 decoloración del radical se determina a 515 nm y la cuantificación se realiza, empleando soluciones patrón de Trolox y BHT. Aparentemente los compuestos que posean moléculas más pequeñas con mejor accesibilidad al centro activo del radical poseen mayor afinidad por este método (Castañeda, Llica, & Vasquez, 2008; Conde, Rueda, & Patiño, 2012).

1.3 Plantas medicinales

Se las determina como plantas medicinales a las especies vegetales que elaboran metabolitos secundarios denominados principios activos, que corresponden a 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, tienden a disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico que es la enfermedad (F. Muñoz, 1996).

Han constituido desde tiempos remotos dentro de la medicina tradicional un recurso para cubrir las necesidades terapéuticas, constituyen la primera línea de apoyo a la salud en zonas de difícil acceso. En los últimos años su estudio se ha convertido en un hecho científico mundial que trasciende no sólo en beneficio de la salud, sino que también en el sistema productivo y económico de un país, pues la variedad botánica es tan diversa que es casi exclusiva en cada región (O. Muñoz, Montes, & Wilkomirsky, 2001).

Esta afirmación es corroborada pues cada día se presta más atención al estudio de las plantas medicinales, de tal forma que están tomando un gran auge en el mundo actual y haciendo una mayor aplicación en la medicina aplicada como en la investigación experimental que trasciende la mera identificación y que busca su aplicabilidad industrial como fuente de desarrollo. El 80 % de la población mundial, utiliza las plantas como

principal opción a la hora de aliviar sus dolencias, pues llama la atención la creciente demanda sobre todo en los países de mayor desarrollo donde resurge la necesidad de la práctica de la medicina natural y en los países de menor desarrollo constituye un recurso ancestral transmitido de generación en generación como parte de las tradiciones enraizadas en cada uno de los pueblos (Peñalver, 2004).

La importancia de las plantas y los árboles dentro la medicina moderna es la base que sostiene los fundamentos de la aplicabilidad farmacéutica; durante mucho tiempo los remedios naturales y las plantas medicinales constituyeron el principal e incluso el único recurso del que disponía el médico como medio para reestablecer la salud; un echo unísono a lo largo y ancho del planeta y en todos los tiempos corresponde al uso de las plantas medicinales como base de su propia medicina. La diversidad de las plantas medicinales disponible varía según las regiones y los ecosistemas de cada zona donde habitan, es por ello que se debe conservar el ambiente que las sustenta y así se evitaría que muera una tradición de medicina popular y folclórica de nuestros pueblos y antepasados (Hernández, 2016).

1.4 Flora Ecuatoriana

Ecuador es un país con riqueza inmensa en todo lo que se refiere a biodiversidad y hábitats no obstante la mayoría de este patrimonio no es destacado en la magnitud pertinente y la pérdida de hábitats y ecosistemas pone en peligro el estar al tanto de sus potencialidades. La riqueza cultural y la aplicación de dicha biodiversidad, se concretan en una fuente potencial para la investigación (Andrade, Armijos, Malagón, & Lucero, 2009).

La gran diversidad de la flora ecuatoriana ha sido reconocida y estudiada desde hace mucho tiempo, pero no fue sino hace ocho años que, con la publicación del monumental Catálogo de las Plantas Vasculares del Ecuador se documentó la presencia de más de 16000 especies de plantas. Este número en los últimos años se ha incrementado en un 6%, por lo que en la actualidad el número de especies vasculares sobrepasa las 17 000 (Jørgensen & León-Yáñez, 1999).

1.4.1 Flora aromática del Ecuador.

El uso de las plantas medicinales tiene su inicio inmediatamente con la aparición del hombre, posteriormente desde el siglo XIX se iniciaron las ilustraciones de las plantas con usos en la medicina tradicional. Dentro del reino vegetal existen plantas aromáticas, en este diverso grupo buena parte de las especies son medicinales. La característica de las plantas aromáticas es la presencia de aceite esencial, correspondientes a una variedad exclusiva de cada especie, los mismos son producto del metabolismo vegetal, son volátiles y responsables del olor de la planta; la mayoría en su composición química cuenta con monoterpenos y sesquiterpenos principalmente, aunque también pueden estar acompañados de otros compuestos químicos (Lizcano & Vergara, 2008; Patzelt & Echeverría, 1996).

Algunos estudios encaminados hacia la identificación y caracterización de especies nativas propias de dos provincias principalmente: Loja y Zamora Chinchipe; se han reportado un total de 275 especies de plantas con 68 usos terapéuticos diferentes. De esta cantidad total, 152 especies son nativas, 57 son introducidas, 5 son cultivadas tradicionalmente, 8 son endémicas de Loja o de Zamora Chinchipe y las 53 especies sobrantes ya han sido estudiadas y publicadas (Tene et al., 2007).

1.5 La Familia Piperaceae

La familia Piperaceae comprende un número extenso de arbustos, hierbas y lianas que se encuentran en lugares sombríos y húmedos de todo el mundo. Desde la antigüedad la Familia Piperaceae, se conoce como una de las familias más grandes e importantes, donde los géneros más representativos son Piper y Peperomia, siendo el más representativo el género Piper, por su elevado grado de contribución económico, con respecto a sus aplicaciones a nivel alimenticio, industrial y medicinal (Parra, Delgado, & Cuca, 2011; Ramirez, Cartuche, Morocho, Aguilar, & Malagon, 2013). Una revisión de la flora ecuatoriana reporta cuatro géneros de la familia Piperaceae, incluyendo 215 especies de Piper, 75 de ellas endémicas (Ramirez et al., 2013).

La familia Piperaceae comprende de 10 géneros y cerca de 1200 especies, de las cuales

700 corresponden al género Piper (Calle, 1983; Celis et al., 2008). Los ejemplares de esta familia pueden ser arbustos, frutices o hierbas. Entre las especies más considerables que podemos encontrar son los arbustos que crecen en climas cálidos o fríos característicos del clima de la amazonia ecuatoriana. De esta familia se han aislado: hidrocarburos, fenilpropanos, lignanos, flavonas, isobutilamidas, alcaloides, epóxidos y aceites esenciales. La abundancia del material vegetal y la diversidad de usos de estas plantas las convierten en uno de los segmentos naturales con mayor preferencia para la investigación (Calle, 1983).

Diversos estudios han mostrado que las fracciones volátiles de diferentes especies Piperaceae están conformadas principalmente por monoterpenos y sesquiterpenos; sin embargo, en algunas especies se encuentra un alto contenido de derivados fenilpropanoides (Martínez, Stashenko, Fernández, Bottia, & Mendivelso, 2007).

1.5.1 El género *Piper*.

Plantas del género Piper, son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de vaginitis, desordenes intestinales, como antimicrobiano y cito tóxico. El género Piper, perteneciente a la familia Piperaceae, ha sido objeto de estudios fitoquímicos y biológicos, motivados por sus numerosas aplicaciones etnobotánicas. Los aceites esenciales, obtenidos de diferentes plantas pertenecientes a este género, inhiben el crecimiento de un amplio grupo de microorganismos que causan infecciones importantes al hombre, las plantas y los animales (Y. Sánchez et al., 2009).

A raíz de sus diversos usos, se supone que esta familia es bien tolerada por el hombre. Una cualidad de las plantas de este género es la presencia de aceites esenciales, que son característicos de cada especie (Celis et al., 2008). A un gran número de compuestos aislados del género piper se les han realizado diversos estudios y ensayos de actividad biológica, obteniendo valiosos resultados que han permitido inclusive el corroborar sus usos etnobotánicos (Parra et al., 2011).

En el género Piper se estima que existen aproximadamente 700 especies algunas utilizadas para la atención primaria en salud (Dorman & Deans, 2000). Estudios previos reportaron su utilidad como antiviral, antibacteriano y particularmente como antimicótico. Estas

propiedades biológicas son atribuidas a la presencia de lignanos y flavonoides en los extracto (Reddy et al., 2004).

1.5.1.1 *Piper carpunya* Ruiz & Pav.

Piper carpunya Ruiz & Pav. Conocida común mente como Guabiduca es un arbusto de 2 a 6 metros de altura que habita principalmente en los Andes y en la Amazonía a una altitud de 1000 a 2000 msnm (Mendoza, Linares-Palomino, & Kvist, 2006). Las hojas de *P. carpunya* Ruiz & Pav. (Piperaceae), son ampliamente utilizados en la medicina tradicional en los países tropicales y subtropicales de América del Sur como es el caso de las comunidades del sur del Ecuador (Cárdenas-Tello, Pozo-Rivera, Almirall, & Roque, 2016); como un anti-inflamatorio, anti-úlceras, antidiarreico y un remedio anti-parasitario, así como un remedio eficaz para las irritaciones de la piel (Quílez et al., 2010; Trabadela et al., 2008).

Taxonomía de <i>Piper carpunya</i>	
Reino: Plantae	
División: Magnoliidae Novák ex Tajt.	
Clase: Equisetopsida C. Agardh	
Orden: Piperales Bercht. Y J. Presl	
Familia: Piperaceae Giseke	
Género: <i>Piper</i> L.	
Especie: <i>carpunya</i>	<p>FIGURA 8. Muestra botánica de <i>P. carpunya</i>. Fuente: El autor.</p>

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Metodología

En la figura 9 se muestran las representaciones gráficas de las fases de los análisis realizados sobre la serie de métodos establecidos para llevar a cabo esta investigación.

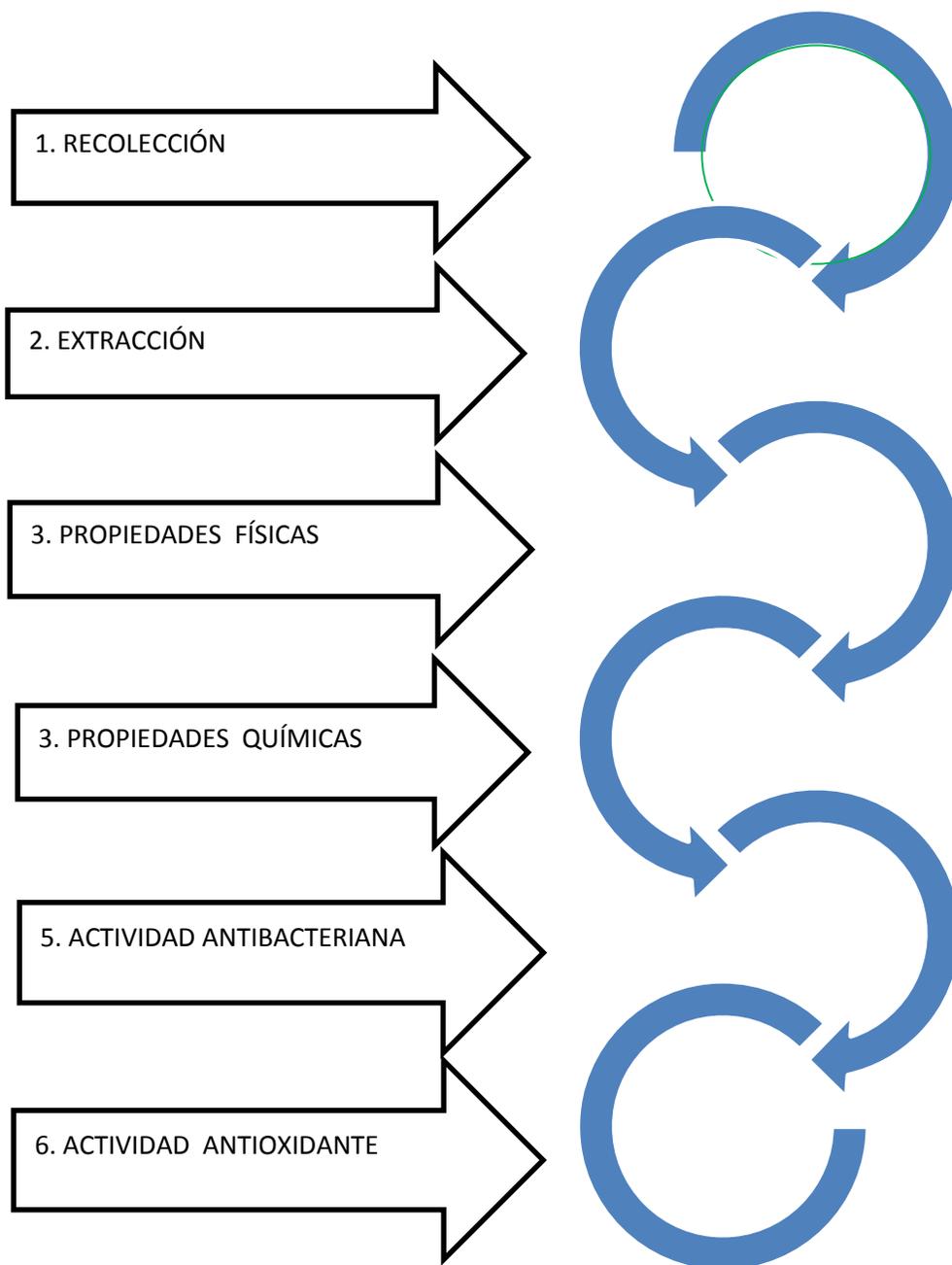


FIGURA 9. Esquema metodológico para la determinación de propiedades
Fuente: El autor

2.1.1. Recolección del material vegetal.

La recolección de la muestra vegetal de las partes aéreas de *la P. carpunya* se llevó a cabo en la comunidad El nuevo porvenir, perteneciente a la parroquia 28 de mayo, cantón Yacuambi, provincia de Zamora Chinchipe, ubicada en la zona Sur del Ecuador en la región Amazónica y perteneciente a la zona distrital número 7. En la figura 10 se observa la ubicación geográfica de dicha especie con las siguientes coordenadas: latitud 78°51'W, longitud 3°43'S y altura 1025 m.s.n.m. La identificación taxonómica de la especie fue reconocida por el Ing. Nixon Cumbicus, encargado del herbario de la UTP.

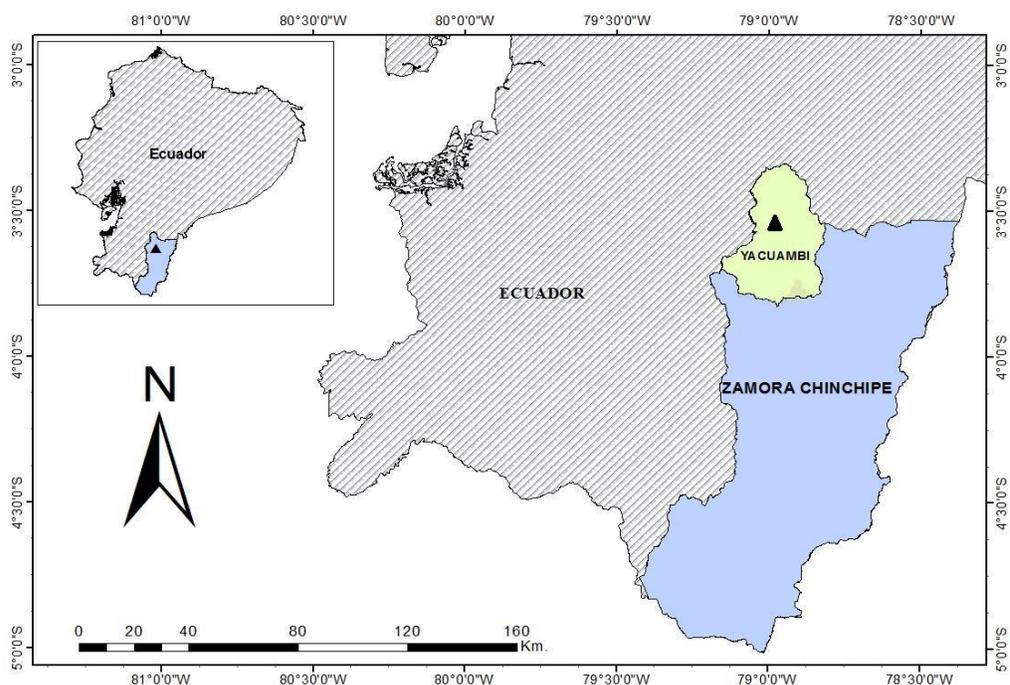


FIGURA 10. Mapa de recolección de la especie *P. carpunya*

Fuente: Benítez, A

La especie fue recolectada en estado de fructificación, se realizó tres recolecciones distintas, del 14 de enero al 12 de febrero del 2015, con un intervalo aproximado de 15 días entre una y otra recolección. Una vez recolectada fue transportada hasta los laboratorios del Departamento de Química y Ciencias Exactas de la UTP para su tratamiento post cosecha el cual consistió en seleccionar el material vegetal, eliminando ciertas partes deterioradas de las muestras con el fin de evitar posibles contaminaciones y que estos interfirieran en nuestros resultados. Debido a que el deterioro del material vegetal fresco es bastante acelerado el tiempo estimado entre la recolección y la destilación no excedió las

12 horas para evitar la contaminación por descomposición de la materia vegetal en la extracción del aceite esencial.

2.1.2 Extracción del aceite esencial.

Los aceites esenciales se obtuvieron a partir de las hojas de la especie vegetal. La extracción se realizó por medio de destilación por arrastre de vapor que se llevó a cabo en un equipo de destilación de tipo Clevenger (figura 11), estos equipos tienen en su parte interna 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 por 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, de esta manera se obtiene el aceite esencial.



FIGURA 11. Equipo de destilación.

Fuente: El autor

Una vez realizada la destilación se procedió a recoger el aceite esencial en una probeta para medir su volumen, para eliminar los residuos de agua que pudieran quedar de la destilación se le agregó una pequeña cantidad de sulfato anhidro de sodio, luego se almacenó el aceite en frascos de vidrio ámbar herméticamente cerrados y debidamente etiquetados, con su respectivo código para cada aceite se hizo constar el nombre de la

especie vegetal, el número de recolección, número de destilación y fecha de destilación (figura 13).

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.

2.1.3 Determinación de las propiedades físicas

Se determinó la densidad relativa, el índice de refracción y la actividad óptica del aceite esencial de las hojas de *P. carpunya* (guaviduca).

2.1.3.1 Determinación de la humedad de la planta.

El procedimiento se lo realizó por triplicado en cada una de las recolecciones con el fin de obtener resultados confiables, al realizar los cálculos respectivos para determinar la humedad de la especie citada. El procedimiento fue establecido por el departamento de química y ciencias exactas de la Universidad Técnica Particular de Loja y se encuentra en el Anexo I.

2.1.3.2 Determinación del rendimiento en aceite esencial.

El rendimiento se determinó de cada una de las destilaciones, relacionando el volumen de aceite obtenido (figura 12) con la cantidad de materia vegetal utilizada en la destilación; finalmente se reportó un valor promedio de todas las destilaciones (Ver Anexo II).



FIGURA 12. Recolección del aceite extraído.

Fuente: El autor



FIGURA13. Etiquetado y almacenamiento.

Fuente: El autor

2.1.3.3 Densidad relativa del aceite esencial.

La densidad es una magnitud física que relaciona la cantidad de materia existente con el volumen que ocupa, a una determinada temperatura y presión atmosférica (Burbano & Muñoz, 2003). La densidad del aceite esencial se determina tomando como referencia al agua destilada.

La determinación de la densidad del aceite esencial se realizó según la norma AFNOR NF T75-111 (Ver Anexo III), para lo cual se hizo uso del picnómetro de 1 mL (figura 14), un termómetro y una balanza analítica (figura 15).

Para determinar la densidad relativa del aceite esencial *P. carpanya*, a los valores obtenidos se calculó la media y desviación estándar pues al tratarse de tres muestras en toda a experimentación es necesario realizarle un análisis matemático.



FIGURA 14. Picnómetro 1ml con aceite.

Fuente: El autor



FIGURA 15. Balanza analítica

Fuente: El autor

2.1.3.4. Índice de refracción del aceite esencial.

La propiedad que tienen los aceites de refractar la luz polarizada es una característica particular aprovechada para su control de pureza, ya que cada aceite presenta un índice de refracción característico. De la misma manera los aceites esenciales presentan un poder rotatorio particular, debido a que algunos de sus compuestos químicos son ópticamente activos (Bandoni, 2002).

La determinación del índice de refracción se lo realizo según la norma AFNOR NF T75-112 (Ver Anexo IV) utilizando un refractómetro ABBE (figura 16) que es un dispositivo electrónico que mide la velocidad de la propagación de luz en el aceite esencial a una temperatura determinada de 20°C.



FIGURA 16. Refractómetro ABBE

Fuente: El autor

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 lecturas obtenidas de los tres aceites de las recolecciones de esta investigación.

2.1.3.5. Actividad óptica del aceite esencial.

La actividad óptica o poder rotatorio de una sustancia es su capacidad para desviar la luz polarizada. Se mide en grados y es una magnitud específica de cada aceite esencial (M. F. O. Sánchez, 2006).

Aquellas sustancias que no producen rotación en la luz polarizada son ópticamente inactivas. Cuando un compuesto ópticamente activo, rota la luz polarizada en el sentido de las agujas del reloj se dice que es dextrógiro y se representa por (+). Las sustancias que rotan la luz en sentido contrario a las agujas del reloj son levógiras y se representan por (-) (Douglas A Skoog, Holler, & Nieman, 1998).

La determinación de la actividad óptica se realizó en base a la norma ISO 592-1998 (Ver Anexo V) para medir la actividad óptica se usó un polarímetro digital modelo Mrc-Automatic Polarimeter P810 y una celda de 10 cm de longitud, en el cual se midió la capacidad para desviar la luz polarizada del aceite esencial de nuestra muestra (figura 17 y 18).



FIGURA 17. Polarímetro digital

Fuente: Andrade, 2016.



FIGURA 18. Celda del polarímetro

Fuente: Andrade, 2016.

2.1.4 Determinación de la composición química del aceite esencial.

2.1.4.1 Cromatografía de gases.

La cromatografía de gases (CG) es una de las técnicas cromatográficas, disponibles para analizar compuestos que tienen un nivel suficiente de volatilidad.

La composición química del aceite esencial de las hojas de *P. carpunya* se determinó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-ES) y al detector de ionización de llama FID (CG-FID) (figura 19), dichas corridas cromatográficas se hicieron en dos columnas, una no polar DB5-MS y una polar HP-INNOWAX, con la finalidad de llevar a cabo el análisis cualitativo y cuantitativo respectivamente.



FIGURA 19. Cromatógrafo de gases

Fuente: El autor

2.1.4.1.1 Preparación de la muestra

Cada muestra de aceite esencial para las inyecciones cromatográficas se prepararon en un vial de cromatografía en el cual se colocó 990 μ L de diclorometano y 10 μ L de aceite, obteniéndose una dilución al 1% de aceite esencial, para los 3 aceites obtenidos en la investigación (figura 20).



FIGURA 20. Viales listos para inyección

Fuente: El autor

2.1.4.1.2 Análisis del aceite esencial en CG-MS y CG-FID.

La identificación de los componentes químicos del aceite esencial de las hojas de *P. carpunya* por Cromatografía de Gases acoplado a la Espectrometría de Masas (CG-MS) se hizo mediante un Cromatógrafo de Gases Agilent obteniendo los espectros de cada compuesto individual. Las respectivas inyecciones se realizaron en las columnas capilares DB5-MS y HP-INNOWAX.



FIGURA 21. Cromatógrafo de Gases Agilent serie 6890N, acoplada a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973 Inert

Fuente: Laboratorio de química

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” (figura 21).

Se utilizó dos tipos de columnas capilares, una columna no polar que fue DB5-MS y una columna polar que fue HP-INNOWAX. El tamaño de las columnas fue de 30mx0,25mmx0,25µm. La columna no polar está recubierta internamente de 5%-Fenilmetilpolisiloxano y la columna polar tiene un recubrimiento interno de polietilenglicol.

La temperatura límite para la columna DB5-MS es de 325°C y para la columna HP-INNOWAX la temperatura es de 260°C.

2.1.4.1.3 Corrida cromatográfica en la columna DB5-MS acoplada a espectrometría de masas.

Para realizar las respectivas corridas cromatográficas se usaron algunas medidas bajo los cuales se inyectaron las muestras del aceite esencial *P. carpunya*. 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 22.

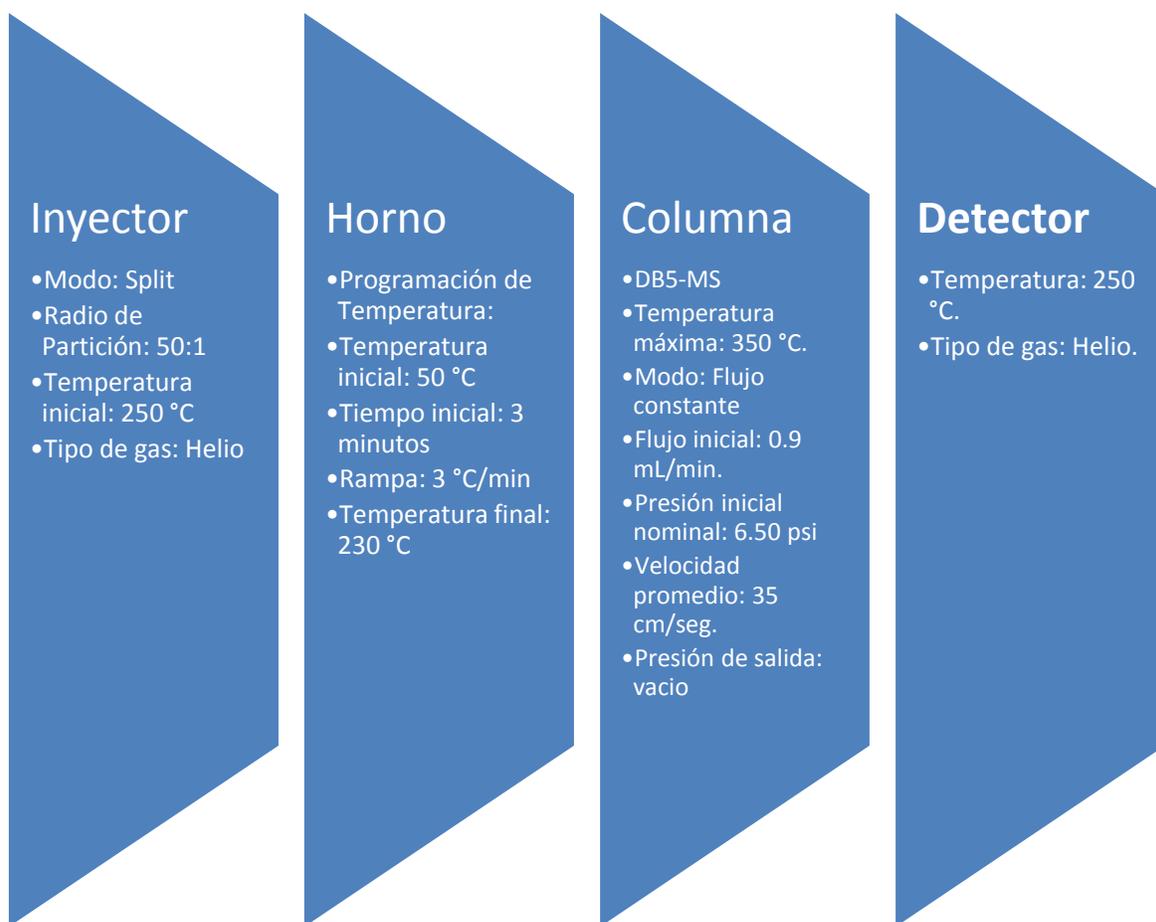


FIGURA 22. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna no polar DB5-MS.

Fuente: El Autor.

2.1.4.1.4 Corrida cromatográfica en la columna HP-INNOWAX acoplada 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 23.

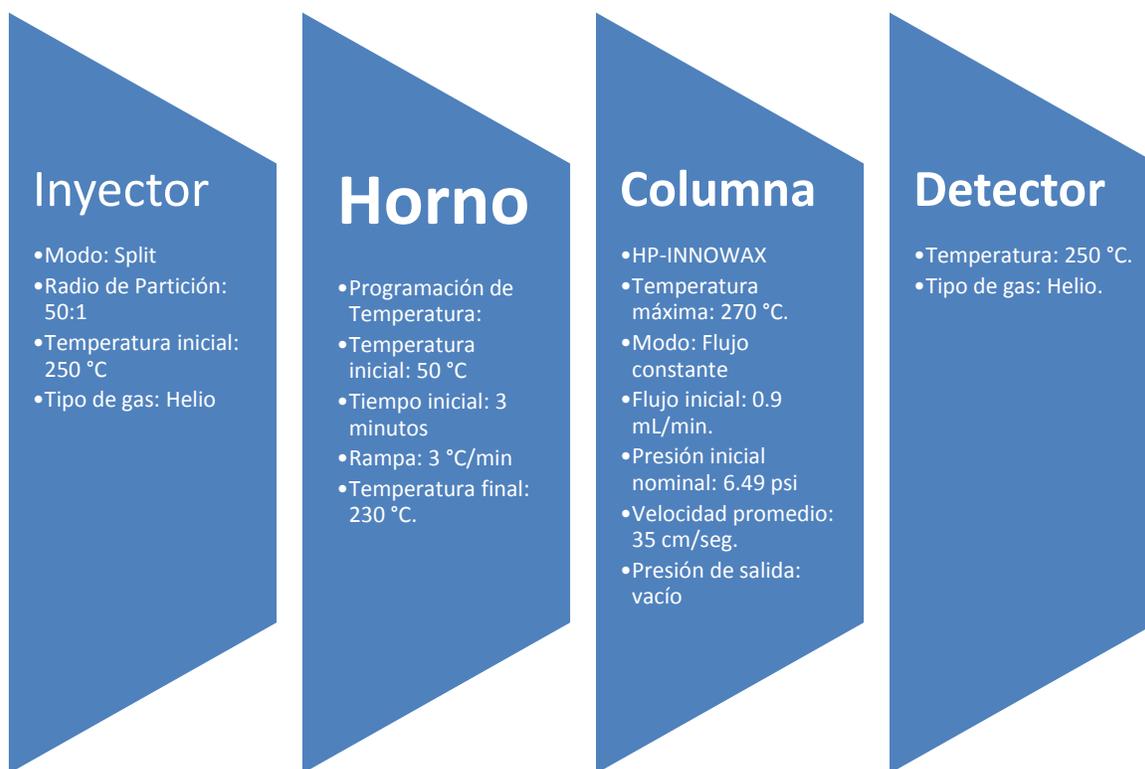


FIGURA 23. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna polar HP-INNOWAX

Fuente: El Autor.

*2.1.4.1.5 Identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos químicos del aceite esencial de *P. carpunya*.*

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 es proporcional a la concentración del compuesto lo que 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 retención de Kovats aritmético (IR) 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:

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

Dónde:

IR: Índice de retención de Kovats aritmético;

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

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

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

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

La identificación de los compuestos se llevó a cabo en base a los índices de retención de Kovats aritméticos (IR) determinados experimentalmente en las corridas cromatográficas tanto en la columna polar como no polar, valores que se compararon con los reportados por Addams,2007; bases de datos electrónicas como Nist (National Institute of Standards and Technology) y en artículos científicos; 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.

2.1.4.1.6 Corrida cromatográfica en la columna no polar DB5-MS, 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; así mismo también se inyectó hidrocarburos, previo a la inyección de las

muestras de aceite esencial de las hojas de *P. carpunya*. Lo que difiere son las condiciones en las que opero el cromatógrafo. Estas condiciones se muestran en la figura 24.

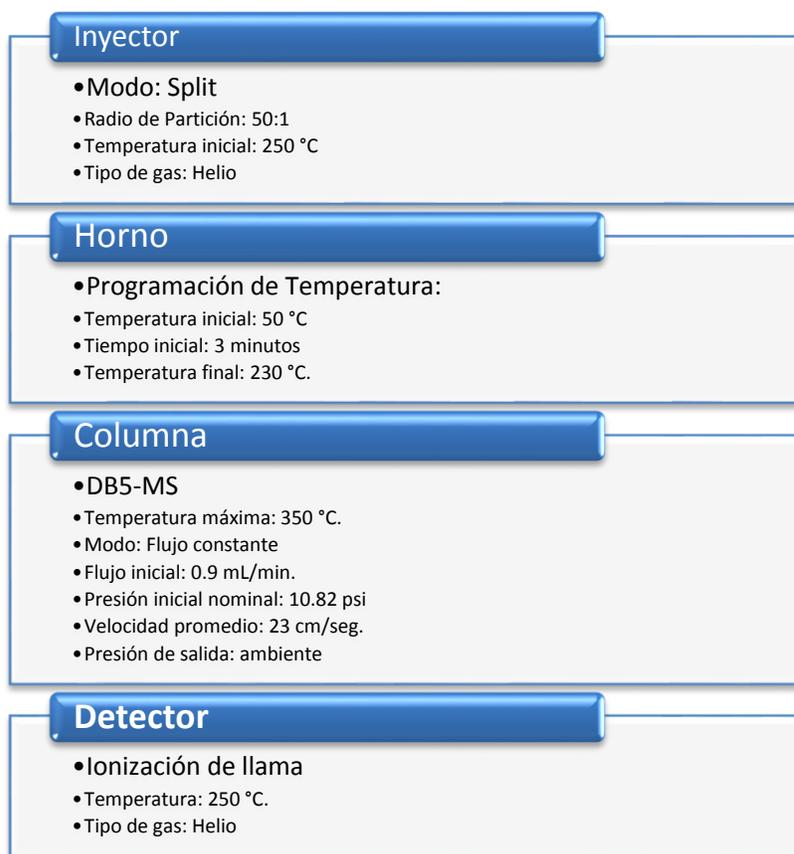


FIGURA 24. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna no polar DB5-MS acoplada a un detector de ionización de llama (FID)

Fuente: El Autor.

2.1.4.1.7 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, 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 expuestas en la figura 25.

Inyector

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

Horno

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

Columna

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

Detector

- Ionización de llama
- Temperatura: 250 °C.
- Tipo de gas: Helio.

FIGURA 25. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna polar HP-INNOWAX acoplada a un detector de ionización de llama (FID)

Fuente: El Autor.

2.1.4.1.8 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.

2.1.5 Determinación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *P. carpunya*.

La actividad antibacteriana fue evaluada mediante el método de micro dilución en caldo frente a diferentes cepas bacterianas. Este análisis se basó en la inhibición del crecimiento de microorganismos, mediante diluciones a diferentes concentraciones, reportándose finalmente la Concentración mínima inhibitoria (CMI), del aceite esencial de *P. carpunya*.

2.1.5.1 Determinación de la actividad biológica del aceite esencial de *P. carpunya*.

Para evaluar la actividad biológica se utilizó diferentes tipos de cepas bacterianas patógenas, para determinar si el aceite de las hojas de *P. carpunya*, 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 PATÓGENOS	
CEPAS BACTERIANAS	
<i>Bacterias Gram-negativas</i>	<i>Bacterias Gram-positivas</i>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) • <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 9997) • <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) • <i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 8427) • <i>Salmonella typhimurium</i> (LT2) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) • <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)

Fuente: El Autor.

2.1.5.2. Prueba utilizada para evaluar la actividad antibacteriana.

La actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *P. carpunya*, se determinó utilizando el método de micro dilución 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).

2.1.5.2.1. Método micro dilución en caldo.

El procedimiento de micro dilución 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.

2.1.5.2.2. 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).

2.1.5.2.3. 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.

Medios de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada bacteria.		
Cepa bacteriana	Condiciones de incubación	Medio de cultivo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Temperatura: 37°C Tiempo: 14- 16 horas	Caldo triptisoya
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 9997)	Temperatura: 37°C Tiempo: 14- 16 horas	Caldo triptisoya
<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 8427)	Temperatura: 37°C Tiempo: 14- 16 horas	Caldo Muller Hinton
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	Temperatura: 37°C Tiempo: 14- 16 horas	Caldo triptisoya
<i>Salmonella typhimurium</i> (LT2)	Temperatura: 37°C Tiempo: 14- 16 horas	Caldo Nutritivo Oxoid
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	Temperatura: 37°C Tiempo: 14- 16 horas	Caldo infusión cerebro-corazón
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	Temperatura: 37°C Tiempo: 14- 16 horas	Caldo triptisoya

Fuente. American Type Culture Collection.

2.1.5.2.4. 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.

2.1.5.2.5. Procedimiento.

El análisis del aceite, se realizó en una cabina de seguridad, previamente limpia y esterilizada para evitar contaminaciones. La prueba se realizó en microplacas de 96 pocillos empleando el procedimiento de dilución doble seriada: del caldo Mueller Hinton se transfirió 180 μL a cada pocillo de la primera fila, y 100 μL a los pocillos restantes, luego se adicionaron 20 μL de la solución de aceite diluido a cada pocillo de la primera fila excepto a los tres últimos pocillos, los cuales contendrán: 1) como control de esterilidad (200 (μL) de caldo Mueller Hinton). 2) control negativo (180 (μL) caldo Muller Hinton + 20 (μL) DMSO) y 3) como control positivo (180 μL caldo Muller Hinton + 20 μL de Gentamicina de 1,953($\mu\text{g}/\text{mL}$) para todas las bacterias utilizadas a excepción de *Enterococcus faecalis* para la cual se empleó Gentamicina de 15,625($\mu\text{g}/\text{mL}$) y *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus vulgaris* que se empleó Gentamicina de 3,906 ($\mu\text{g}/\text{mL}$). 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 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) (figura 26). El mismo procedimiento fue aplicado para el control positivo, negativo y de esterilidad.

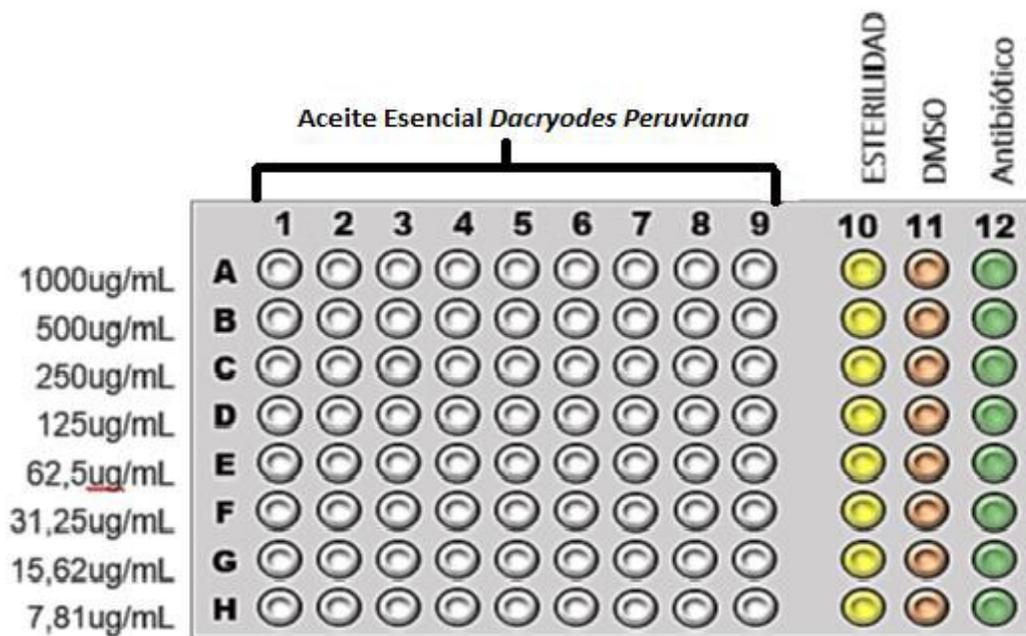


FIGURA 26: Modelo de Microplaca IC96 para bacterias con las concentraciones de aceite ($\mu\text{g/mL}$).

Fuente: Andrade, 2016.

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 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ de 18-24h.

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

Una vez retiradas las placas de micro dilución 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 (figura 27).



FIGURA 27. Micro placa previa a la lectura de la CMI antibacterial.

Fuente: El autor

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

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.

2.1.6 Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de las hojas de *P. carpunya*.

La evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de las hojas de *P. carpunya*, se realizó mediante dos métodos espectrofotométricos: 1). Capacidad de atrapamiento del catión – radical ABTS⁺ y 2). Radical DPPH.

Las mediciones se determinaron según el cambio de la absorbancia por acción del aceite esencial. Se utilizó un espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS Scanning 333907 (figura 28). Las longitudes de onda empleadas en cada método fueron 734nm para la lectura de ABTS⁺ y 515nm para DPPH.



FIGURA 28. Espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS Scanning 333907

Fuente: El autor

2.1.6.1 Preparación de la muestra de aceite esencial de *P. carpunya*.

Para realizar el análisis de la muestra mediante los métodos mencionados, se preparó una solución con 5mg de aceite esencial en 5 ml de MeOH (1000 ppm), del cual se procedió a realizar las respectivas diluciones, 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 muestran las relaciones para las diluciones, cabe destacar que el volumen final de cada dilución fue de 5000 μ L.

Tabla 3. Dilución de aceite esencial para actividad antioxidante.

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

Fuente. Investigación Experimental

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

ABTS⁺. o ensayo del ácido 2,2-anizobis-(3-etilbenzotiozalin-6sulfónico); también se denomina ensayo TEAC por sus siglas en inglés: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity. Este método se realizó usando Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico) como compuesto patrón, el fundamento se basa en que usando este patrón se genera el catión ABTS⁺ que posteriormente son captados por los antioxidantes del aceite esencial (Conde et al., 2012).

El radical ABTS⁺ posee una coloración verde azulada que se va perdiendo según la capacidad antioxidante del aceite esencial.

2.1.6.2.1 Solución patrón y de trabajo de ABTS⁺.

Para preparar la solución patrón se mezclaron 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 aforaron 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 aforaron 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.

2.1.6.2.2. 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 TEAC que es la capacidad antioxidante equivalente a Trolox.

Por un lado se pesaron 25 mg de Trolox y se aforaron en un balón de 100mL con metanol mientras que para BHT se pesaron 22mg 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 fue de 5000 μ L.

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

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

Fuente. Investigación Experimental

Se tomaron 150 μ L de cada dilución y 2850 μ L 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.

2.1.6.2.3. Lectura de muestras.

Para determinar si el aceite esencial de las hojas de *P. carpunya* 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 29).



FIGURA 29. Muestras del aceite esencial de *P. carpunya*, analizadas mediante el método ABTS⁺

Fuente: Andrade, 2016.

2.1.6.3. Método radical DPPH.

Este método se basa en la reducción del radical DPPH. (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) por los componentes antioxidantes de la muestra de aceite esencial. Este radical posee una coloración púrpura que se va perdiendo progresivamente cuando la muestra que se añade

posee capacidad antioxidante. Esta decoloración se puede medir mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 515nm.

Aparentemente los compuestos que posean moléculas más pequeñas con mejor accesibilidad al centro activo del radical poseen mayor afinidad por este método.

2.1.6.3.1 Solución patrón y de trabajo para DPPH.

Para realizar la solución patrón se pesaron 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 tomaron 10mL y se adicionaron 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.

2.1.6.3.2. 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.

2.1.6.3.3. 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 30).



FIGURA 30. Muestras del aceite esencial de *P. carpunya*, analizadas mediante el método DPPH

Fuente: El autor

2.1.6.4. 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.

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

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 (CI_{50}) de la muestra. El CI_{50} 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 CI_{50} , 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.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Humedad

El porcentaje de humedad de la materia vegetal se la presenta en la tabla 5, en la misma se obtienen la media del porcentaje de humedad de las destilaciones realizadas para cada recolección con su respectiva desviación estándar.

Tabla 5. Porcentajes de humedad de la materia vegetal

Recolección	Humedad relativa (%)	\bar{X}	σ
PC 1	71,63		
PC 2	69,03	68,25	3,84
PC 3	64,08		

PC: *Piper carpunya* : 1 Primera recolección; 2 Segunda recolección; 3 Tercera recolección

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

σ :Desviación estándar

Fuente. El autor

Al realizar un análisis comparativo entre los promedios de las tres recolecciones determinados en la tabla 5 se puede observar que el porcentaje de humedad mayoritario corresponde para a la primera recolección (71,63 %); 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 según lo establecen Margulis y Sagan (Margulis & Sagan, 2012).

Cabe recalcar que las recolecciones de la muestra vegetal se las realizo en distintas fechas, aproximadamente cada 15 días, debido a estos cambios en la época de recolección el ambiente influyo en la humedad de la planta, considerando que la zona donde se encontraba la muestra es propensa al azote de vientos fuertes y lluvias frecuentes que hicieron que exista variación de humedad en las diferentes recolecciones.

Sin embargo los datos se encuentran en concordancia con la literatura pues se establece que el valor de la humedad relativa de plantas frescas varía entre el 60 - 80% (Sharapin, 2000).

3.2 Rendimiento

En la tabla 6 se detallan los valores obtenidos de la media de cada uno de los porcentajes del rendimiento obtenido de las destilaciones que corresponden cada una a su recolección respectiva, a partir de estos promedios se calculó su respectiva desviación estándar.

Tabla 6. Porcentajes de rendimiento de la materia vegetal

Recolección	Rendimiento (%)	\bar{X}	σ
PC 1	0,80		
PC 2	0,78	0,80	0,03
PC 3	0,83		

PC: *Piper carpunya* : 1 Primera recolección; 2 Segunda recolección; 3 Tercera recolección
 \bar{X} : Media aritmética correspondiente a las diferentes recolecciones
 σ :Desviación estándar

Fuente. El autor

Dados los porcentajes expuestos en la tabla anterior determinamos que el rendimiento más bajo se obtuvo de la segunda recolección con un rendimiento de 0,78%, a su vez el rendimiento más representativo es el de la tercera recolección con un 0,83%. Dentro de los múltiples criterios por los cuales puede existir una variación en el rendimiento de los aceites esenciales están el origen del material vegetal, especie y órgano de la especie, condiciones climáticas y de crecimiento, manejo y almacenamiento post-cosecha, método de obtención del aceite entre otros (Agnihotri, Wakode, & Ali, 2012; K. Ochoa, Paredes, Bejarano, & Silva, 2012; Pino, Sánchez, Rojas, Abreu, & Correa, 2012).

Según la categorización propuesta por el organismo de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED Argentina), los valores de rendimiento menores a 0,5% los considera bajos, valores entre 0,5 % y 1 % intermedios, y valores superiores a 1% altos (Molares et al., 2009). De acuerdo a esta clasificación el porcentaje de rendimiento obtenido del aceite esencial de *P. carpunya* es intermedio alto. La determinación del rendimiento expresa un criterio representativo para la selección de especies aromáticas que tendrían un potencial comercial, pese a que este es un criterio importante es necesario relacionarlos con otros

análisis como pueden ser la originalidad de los aromas, composición química y efectos farmacológicos entre otros (Bandoni, 2002).

3.3. Propiedades físicas

El aceite esencial extraído de la *P. carpunya* reflejo ser un líquido bastante fluido de color amarillo verdoso. Para determinar la calidad del aceite obtenido se le realizaron las pruebas de las siguientes constantes físicas: densidad, índice de refracción y actividad óptica.

3.3.1 Densidad relativa.

En la tabla 7 se detallan los valores de la densidad promedio de las tres destilaciones que se realizadas obteniendo un promedio final de 0,9321 g/cm³

Tabla 7. Densidad relativa del aceite esencial de *P. carpunya*

Recolección	Densidad (g/cm ³)	\bar{X} (g/cm ³)	σ
PC 1	0,9305		
PC 2	0,9302	0,9321	0,004
PC 3	0,9371		

PC: *Piper carpunya* : 1 Primera recolección; 2 Segunda recolección; 3 Tercera recolección
 \bar{X} : Media aritmética correspondiente a las diferentes recolecciones
 σ :Desviación estándar

Fuente. El autor

La determinación de la densidad tiene un interés representativo en la extracción de aceites esenciales debido a que esta propiedad ayuda a definir la calidad del producto extraído como se lo cita dentro de la bibliografía (Ochoa y Ayala 2011).

Basados en los estudios realizados la gran mayoría de los aceites son menos densos que el agua que tiene una densidad (1 g/cm³); los aceites generalmente se encuentran entre unas densidades de 0.84 y 1.18 g/cm³ dependiendo de los factores ambientales del lugar

de origen (Costa Batllorí, 2004). El valor promedio obtenido de manera experimental es de 0,932g/cm³ que se encuentra dentro del rango normal descrito en bibliografía.

3.3.2 Índice de refracción.

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

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 de *P. carpunya*

Recolección	INDICE DE REFRACCION		\bar{X}	σ
	(nD)			
PC 1	1,4871			
PC 2	1,4872		1,4877	0,0010
PC 3	1,4889			

PC: *Piper carpunya* : 1 Primera recolección; 2 Segunda recolección; 3 Tercera recolección

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

σ :Desviación estándar

Fuente. El autor

El promedio general de los índices de refracción determinados para cada muestra de aceite obtenido por destilación es de 1,488, cabe recalcar que no existe una variabilidad realmente significativa por ello podemos deducir que el aceite en cada una de las muestras fue tratado apropiadamente pues los cambios en este parámetro físico cambia si la muestra se encontrase diluida o contaminada con otras sustancias.

Los índices de refracción reportados con anterioridad de la *P. carpunya* en bibliografía se encuentran entre 1,387 (Castillo Valdéz, 2014) y 1,572 (Riofrío Quezada, 2012) utilizando la norma de referencia AFNOR NF T75-112, y en general para los aceites del genero *Piper*

el índice de refracción promedio se encuentra en 1,485 (Albarracín Montoya & Gallo Palma, 2003) por lo que el valor obtenido está muy próximo a los valores antes reportados.

3.3.3 Actividad óptica específica.

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 de *P. carpunya*

Recolección	ACTIVIDAD OPTICA	\bar{X}	σ
PC 1	3,6°		
PC 2	3,5°	3,5°	0,05
PC 3	3,6°		

PC: *Piper carpunya* : 1 Primera recolección; 2 Segunda recolección; 3 Tercera recolección

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

σ :Desviación estándar

Fuente. El autor

La rotación óptica es un parámetro físico que permite determinar distintos tipos de adulteraciones, tales como adición de compuestos sintéticos o componentes de diferentes orígenes botánicos, los cuales podrían dañar drásticamente las propiedades biológicas u olfatorias, íntimamente relacionadas con la naturaleza de los aceites (Bedoukian, 1967).

Como se puede apreciar en la tabla 9, el valor promedio de la actividad óptica es de +3,549°, 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 (Haynes, 2014).

3.4 Composición Química

3.4.1 Análisis cualitativo y cuantitativo.

La determinación de los compuestos químicos del aceite esencial de *P. carpunya* mediante cromatografía de gases acoplada a Espectrofotometría de masas (CG-EM) y al detector de ionización en llama (CG-FID), se realizó en las columnas DB5-MS y HP-INNOWAX.

Los perfiles cromatográficos están representados en las figuras 31 y 32, obtenidos en la columna no polar DB5-MS y en la columna polar HP-INNOWAX mediante la técnica CG – EM acorde a los parámetros operacionales descritos en la metodología.

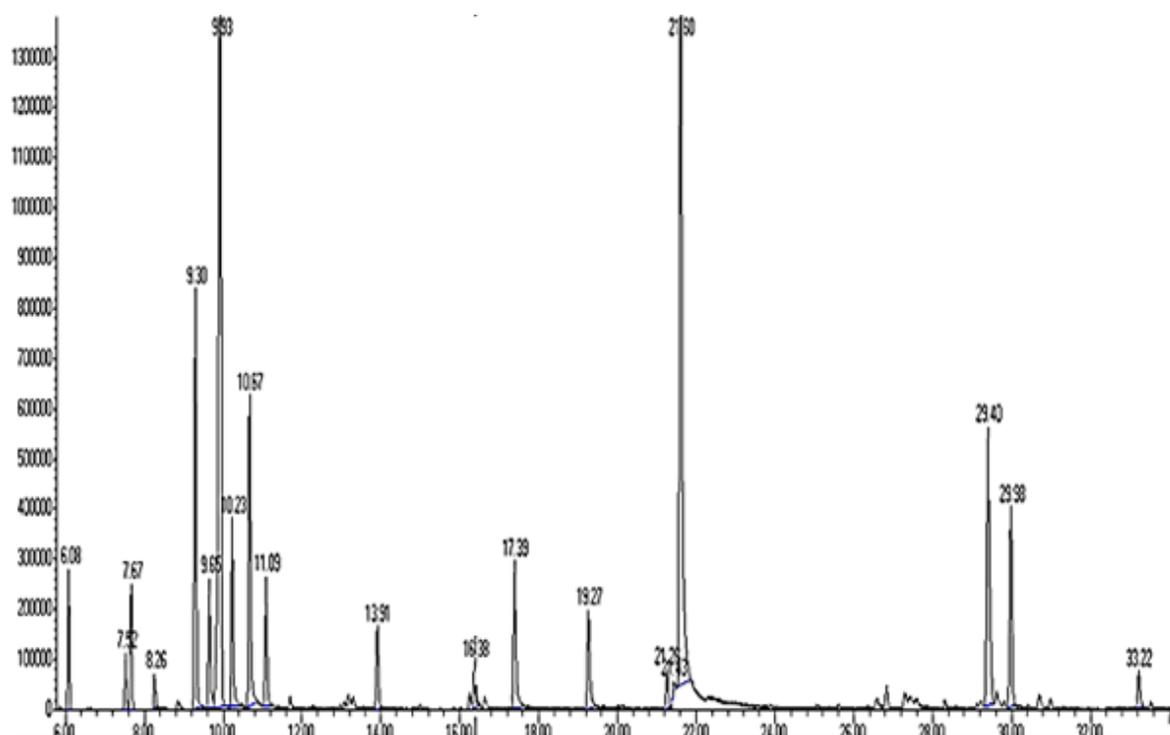


FIGURA 31. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *P. carpunya* en la columna no polar DB5-MS

Fuente: El Autor.

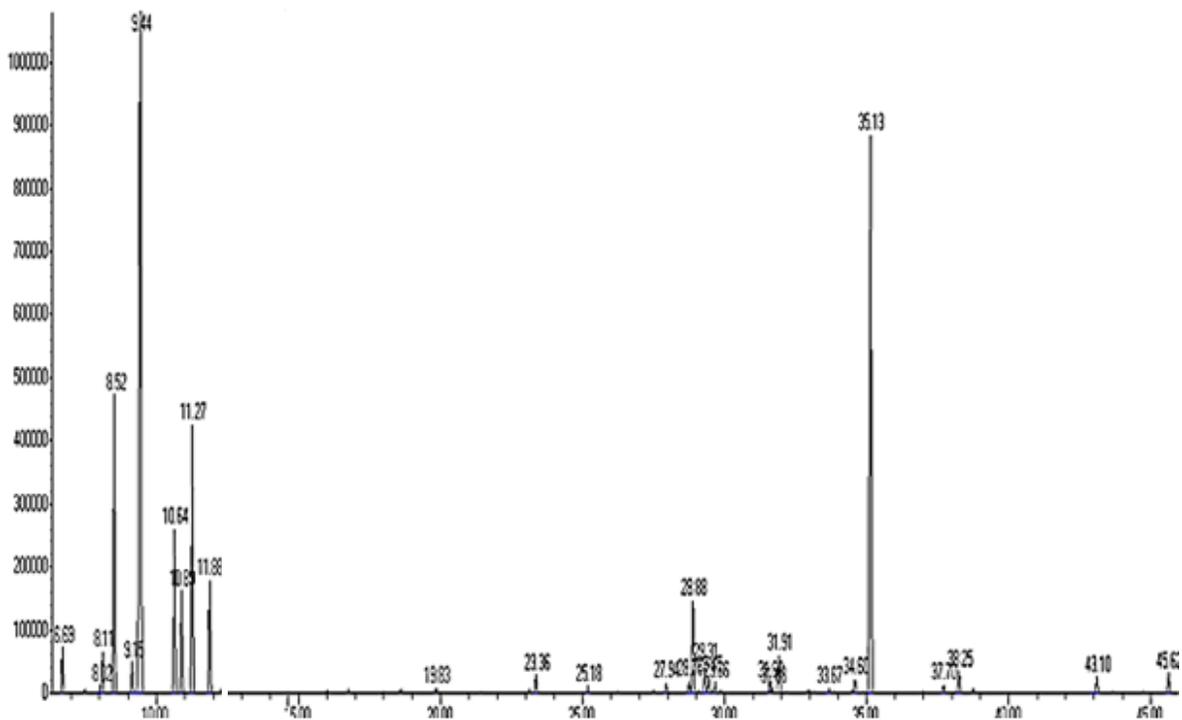


FIGURA 32. Perfi cromatográfico del aceite esencial de *P. carpunya* en la columna polar HP-INNOWAX

Fuente: El autor

Los cromatogramas obtenidos muestran diversos picos los cuales significan un compuesto de área proporcional a su concentración, algunos de ellos se encuentran muy próximos entre si lo que dificulta de cierta manera la identificación, por ello para una identificación más confiable se realizó la integración de cada uno de ellos.

En el análisis cualitativo, se realizó la identificación de los componentes volátiles comparando los índices de retención de Kovats aritméticos (IR) tanto experimentales como los reportados en la literatura para los compuestos analizados en la columna polar y no polar. Además cada compuesto detectado posee su respectivo espectro de masas el cual fue comparado con los espectros que proporciona la base de datos del equipo biblioteca Wiley 7n.

En la tabla 10, se detalla la composición química del aceite esencial de *P. carpunya* en las columnas DB5-MS y HP-INNOWAX; los mismos que están descritos de acuerdo al orden de elución en la columna DB5-MS, resaltando los compuestos con mayores áreas; se indican los índices de retención de Kovats aritmético 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 aceite esencial de *P. carpunya*

N°	COMPUESTOS	DB5 - MS							HP INOWAX - MS								
		IR CAL	IR REF	% DE CANTIDAD RELATIVA +			\bar{X}	σ	IR CAL	IR REF	% DE CANTIDAD RELATIVA +			\bar{X}	σ		
				PC 1	PC 2	PC 3					PC 1	PC 2	PC 3				
1	β -Pinene	971	974 ^a	2,8	2,2	2,2	2,4	0,3	1103	1111 ^b	2,9	2,6	2,4	2,6	0,2		
2	Myrcene	987	988 ^a	0,8	0,7	0,6	0,7	0,1	1162	1173 ^b	1,3	1,3	1,3	1,3	0,0		
3	α -Terpinene	1013	1014 ^a	6,4	6,5	5,8	6,2	0,4	1175	1183 ^b	12,7	12,7	11,9	12,4	0,5		
4	1,8-Cineole	1027	1026 ^a	26,7	24,7	26,8	26,1	1,2	1202	1220 ^c	30,7	25,4	24,1	26,8	3,5		
5	(E)- β -Ocimene	1034	1044 ^a	3,7	3,3	3,1	3,4	0,3	1242	1262 ^b	8,3	7,7	7,7	7,9	0,4		
6	(Z)- β -Ocimene	1044	1032 ^a	6,2	5,6	6,2	6,0	0,3	1366	1382 ^d	5,1	5,2	5,3	5,2	0,1		
7	γ -Terpinene	1054	1054 ^a	2,7	2,3	2,3	2,4	0,2	1234	1253 ^b	3,2	3,0	3,0	3,1	0,1		
8	Terpinolene	1081	1086 ^a	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	1265	1278 ^e	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0		
9	Linalool	1102	1095 ^a	1,0	1,1	1,1	1,1	0,0	1555	1551 ^e	0,6	0,8	0,8	0,7	0,1		
10	Chrysanthenone	1118	1124 ^a	1,3	1,3	1,4	1,4	0,1	1547	1540 ^f	1,2	1,2	1,2	1,2	0,0		
11	Camphor	1141	1141 ^a	0,1	0,1	0,2	0,1	0,0	1506	1522 ^g	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0		
12	Terpinen-4-ol	1172	1174 ^a	1,3	1,7	1,8	1,6	0,2	1602	1616 ^b	0,2	0,3	0,3	0,3	0,0		
13	α -Terpineol	1194	1186 ^a	3,0	3,3	3,2	3,2	0,2	1550	1570 ^b	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1		
14	Ascaridole	1235	1237 ^a	2,4	2,5	2,2	2,3	0,1	1862	1889 ^h	1,3	2,2	2,4	1,9	0,6		
15	Carvenone	1254	1258 ^a	0,2	0,2	0,3	0,3	0,0	1706	1714 ^j	1,1	1,6	1,6	1,4	0,3		
16	Safrole	1287	1285 ^a	23,9	23,1	23,9	23,6	0,4	1876	1863 ^k	20,7	22,4	23,1	22,1	1,2		
17	Isosafrole	1305	1336 ^a	2,5	2,5	2,5	0,0	2018	2029 ^l	3,8	3,6	3,6	3,6	0,1		
18	Thymol acetate	1339	1352 ^a	0,2	0,2	2202	2205 ^m	0,6	0,8	1,0	0,8	0,2		
19	Mefranal	1420	1425 ^a	1,6	1,4	1,5	0,1	1787	1789 ⁿ	1,3	2,1	2,1	1,8	0,5		
20	P-Cymen-7-ol acetate	1422	1421 ^a	1,3	1,3	1436	1452 ^d	0,1	0,2	0,2	0,2	0,0		
21	Bicyclogermacrene	1485	1500 ^a	3,4	3,5	3,8	3,6	0,2	1722	1722 ^b	0,2	0,3	0,3	0,2	0,0		
22	Germacrene-D	1471	1484 ^a	6,4	6,4	7,2	6,7	0,4	1696	1708 ^b	0,3	0,5	0,4	0,4	0,1		
23	β -Sesquiphellandrene	1518	1521 ^a	0,1	0,1	1734	1738 ^o	0,1	0,1	0,2	0,1	0,0		
24	Spathulenol	1567	1577 ^a	1,1	1,2	1,2	1,2	0,1	2120	2129 ⁿ	0,5	0,6	0,8	0,6	0,1		
25	Carotol	1591	1594 ^a	0,4	0,4	0,7	0,5	0,2	2225	2239 ^f	0,5	0,6	0,7	0,6	0,1		
26	Sabinene hydrate	1640	1625 ^a	0,2	0,2	0,2	0,0	1467	1467 ^p	0,3		
27	Shyobunol	1683	1689 ^a	0,5	0,5	1952	1953 ^q	0,4		
*TOTAL IDENTIFICADO =							97,0		*TOTAL IDENTIFICADO =							96,2	

+ = % promedio calculados en base al % de área de los picos reportados en la columna DB5-MS y HP-INNOWAX respectivamente.
 * = Sumatoria del porcentaje relativo de los compuestos identificados en ambas columnas
 PC1= Aceites de la primera recolección; PC2= Aceites de la segunda recolección; PC3= Aceites de la tercera recolección
 \bar{X} = Promedio
 σ = Desviación estándar
 IKcal = Índice de Kovats calculado
 IKref = Índice de retención de Kovats aritméticos reportado en la literatura: ^aref.1; ^bref.2; ^cref.3; ^dref.4; ^eref.5; ^fref.6; ^gref.7; ^href.8; ⁱref.9; ^jref.10; ^kref.11; ^lref.12; ^mref.13; ⁿref.14; ^oref.15; ^pref.16. ver anexo(VI)

Fuente. El autor

En la figura 33 se pueden apreciar los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *P. carpunya* en la columna DB5-MS, entre los cuales tenemos: 1,8-Cineole (26,1%); Safrole (23,6%); Germacrene-D (6,7%); α -Terpinene (6,2%); (Z)- β -Ocimene (6,0%); Bicyclgermacrene (3,6%); (E)- β -Ocimene (3,4%); α -Terpineol (3,2%); Isosafrole (2,5%); γ -Terpinene (2,4%); β -Pinene (2,4%); Ascaridole (2,4%).

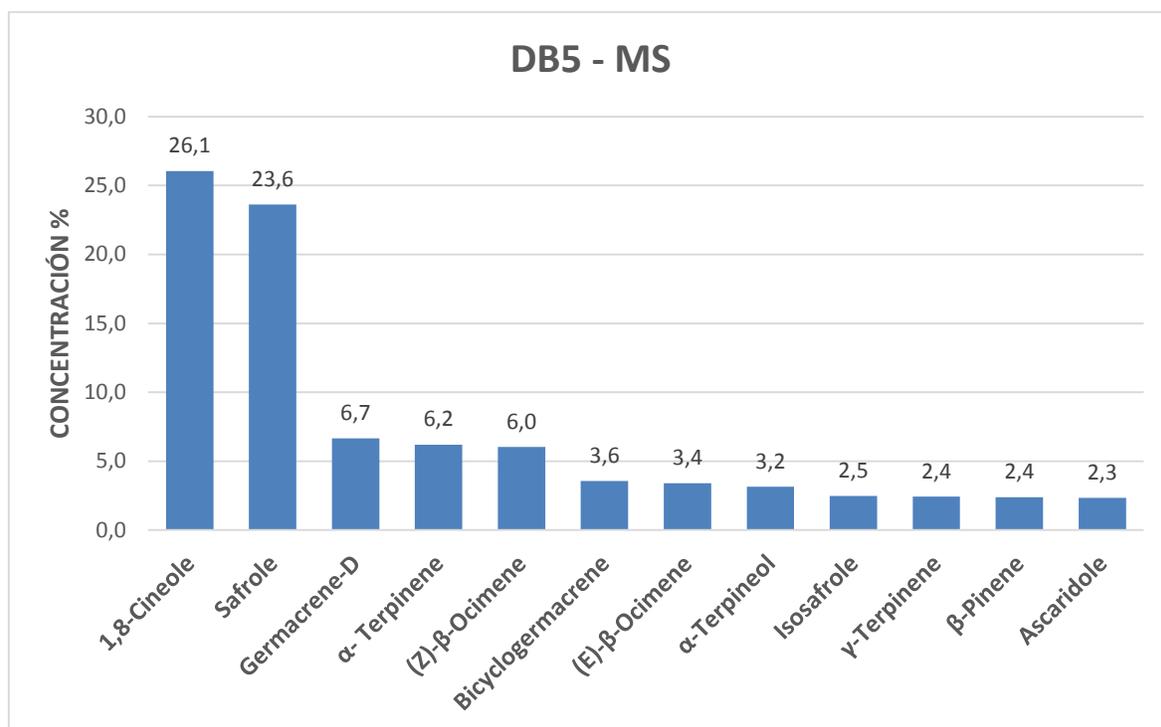


FIGURA 33. Compuestos mayoritarios en la columna no polar DB5-MS

Fuente: El Autor.

Los porcentajes de los compuestos mayoritarios del aceite esencial en la columna HP-INNOWAX, se muestra en la figura 34, entre los más representativos tenemos: 1,8-Cineole (26,8%); Safrole (22,1%); α -Terpinene (12,4%); (E)- β -Ocimene (7,9%); (Z)- β -Ocimene (5,2%); Isosafrole (3,6%); γ -Terpinene (3,1%); β -Pinene (2,6%); Ascaridole (1,9%); Mefranal (1,8%); Carvenone (1,4%); Myrcene (1,3%).

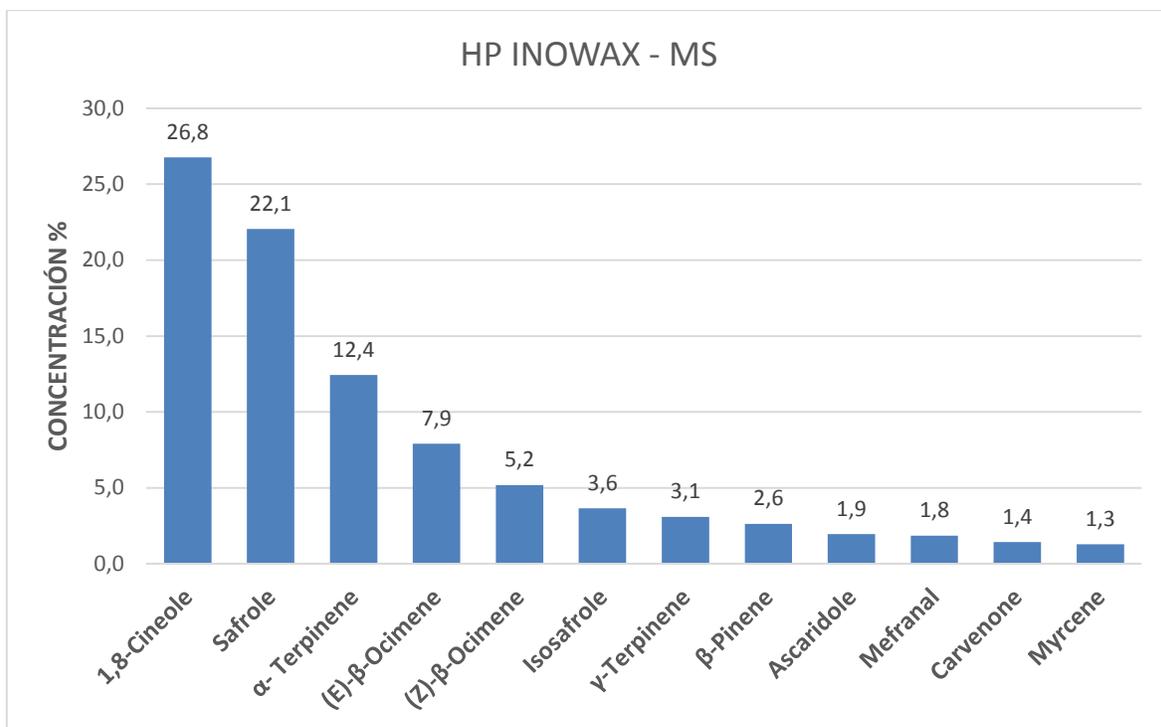


FIGURA 34. Compuestos mayoritarios en la columna polar HP-INNOWAX

Fuente: El Autor.

El análisis cuantitativo se realizó mediante la comparación de los porcentajes determinados de la cantidad relativa de los picos detectados en cromatografía mediante 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 de *P. carpunya*.

Tabla 11. Composición química del aceite esencial de *P. carpanya*

N°	Compuestos	DB5 - MS										HP INNOWAX - MS													
		% de cantidad relativa						\bar{X}		σ		% de cantidad relativa						\bar{X}		σ					
		PC 1		PC 2		PC 3		MS	FID	MS	FID	PC 1		PC 2		PC 3		MS	FID	MS	FID				
		MS	FID	MS	FID	MS	FID					MS	FID	MS	FID	MS	FID					MS	FID		
1	β -Pinene	2,8	2,5	2,2	2,2	2,2	2,2	2,4	2,3	0,3	0,1	2,9	2,8	2,6	1,2	2,4	1,5	2,6	1,8	0,2	0,9				
2	Myrcene	0,8	0,9	0,7	1,1	0,6	1,1	0,7	1,0	0,1	0,1	1,3	1,5	1,3	1,4	1,3	1,8	1,3	1,6	0,0	0,2				
3	α -Terpinene	6,4	6,7	6,5	7,2	5,8	6,7	6,2	6,9	0,4	0,3	12,7	7,5	12,7	8,0	11,9	10,3	12,4	8,6	0,5	1,5				
4	1,8-Cineole	26,7	25,5	24,7	25,9	26,8	26,0	26,1	25,8	1,2	0,3	30,7	29,0	25,4	30,7	24,1	39,6	26,8	33,1	3,5	5,7				
5	(E)- β -Ocimene	3,7	5,8	3,3	6,1	3,1	6,5	3,4	6,1	0,3	0,3	8,3	9,4	7,7	9,3	7,7	12,0	7,9	10,2	0,4	1,5				
6	(Z)- β -Ocimene	6,2	8,3	5,6	8,8	6,2	9,3	6,0	8,8	0,3	0,5	5,1	5,4	5,2	5,3	5,3	6,8	5,2	5,8	0,1	0,9				
7	γ -Terpinene	2,7	2,8	2,3	3,0	2,3	3,4	2,4	3,0	0,2	0,3	3,2	3,0	3,0	2,9	3,0	3,8	3,1	3,2	0,1	0,5				
8	Terpinolene	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0				
9	Linalool	1,0	0,1	1,1	0,1	1,1	0,1	1,1	0,1	0,0	0,0	0,6	0,7	0,8	0,8	0,8	1,0	0,7	0,8	0,1	0,1				
10	Chrysanthenone	1,3	0,6	1,3	0,1	1,4	0,7	1,4	0,5	0,1	0,3	1,2	1,2	0,1	1,2	0,1	1,2	0,1	0,0	0,0				
11	Camphor	0,1	0,1	0,2	0,6	0,2	0,1	0,1	0,3	0,0	0,3	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0				
12	Terpinen-4-ol	1,3	0,9	1,7	1,1	1,8	1,1	1,6	1,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,0	0,0				
13	α -Terpineol	3,0	2,9	3,3	3,4	3,2	3,4	3,2	3,2	0,2	0,3	0,1	0,4	0,2	0,4	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2				
14	Ascaridole	2,4	1,2	2,5	1,3	2,2	1,4	2,3	1,3	0,1	0,1	1,3	1,1	2,2	1,0	2,4	1,4	1,9	1,1	0,6	0,2				
15	Carvenone	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	1,6	0,3	0,7	0,0	0,8	1,1	1,2	1,6	1,6	1,6	1,6	1,4	1,5	0,3	0,2				
16	Safrole	23,9	15,3	23,1	17,1	23,9	19,9	23,6	17,5	0,4	2,3	20,7	18,4	22,4	21,1	23,1	19,9	22,1	19,8	1,2	1,4				
17	Isosafrole	2,5	3,5	2,5	1,9	2,5	2,7	0,0	1,2	3,8	3,1	3,6	2,9	3,6	3,6	3,0	0,1	0,1				
18	Thymol acetate	0,2	0,7	0,2	0,7	0,6	0,1	0,8	0,6	1,0	1,9	0,8	0,8	0,2	0,9				
19	Mefranal	1,6	0,3	1,4	1,5	1,5	0,9	0,1	0,8	1,3	1,5	2,1	2,1	1,8	1,5	0,5				
20	P-Cymen-7-ol acetate	1,3	0,3	1,3	0,3	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,0	0,2	0,1	0,0	0,1				
21	Bicyclgermacrene	3,4	3,7	3,5	2,8	3,8	0,5	3,6	2,3	0,2	1,6	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3	0,5	0,2	0,3	0,0	0,2				
22	Germacrene-D	6,4	1,2	6,4	2,2	7,2	0,8	6,7	1,4	0,4	0,7	0,3	0,5	0,4	0,8	0,4	0,8	0,1				
23	β -Sesquiphellandrene	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2	0,0	0,1				
24	Spathulenol	1,1	1,2	1,2	0,1	1,2	0,1	0,1	0,5	0,1	0,6	0,4	0,8	0,1	0,6	0,2	0,1	0,2				
25	Carotol	0,4	0,4	0,7	0,1	0,5	0,1	0,2	0,5	0,5	0,6	0,4	0,7	0,1	0,6	0,3	0,1	0,2				
26	Sabinene hydrate	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,0	0,0	0,3	0,3	0,3	0,3				
27	Shyobunol	0,5	0,5	0,4	0,1	0,4	0,1				
*TOTAL IDENTIFICADO =								97,0	87,3									**TOTAL IDENTIFICADO =				96,2	96,3		

Compuestos según el orden de elución de la columna DB-5ms
 * = Sumatoria del porcentaje relativo de los compuestos identificados en la columna DB5-MS y DB5-FID
 ** = Sumatoria del porcentaje relativo de los compuestos identificados en la columna HP-INNOWAX- MS Y HP-INNOWAX-FID
 PC1: Aceites de la primera recolección PC2: Aceites de la segunda recolección PC3: Aceites de la tercera recolección
 \bar{X} = Promedio
 σ = Desviación estándar

Fuente. El autor

Del aceite esencial de *P. carpunya* se determinaron 27 compuestos, de los cuales 23 compuestos han sido identificados; en la columna DB5-MS se determinaron 27 compuestos con un porcentaje de identificación de 97,0% y en la columna HP-INNOWAX se identificaron 25 compuestos que representan el 96,3 %.

P. carpunya es una especie que presentan estudios realizados en diferentes tipos de caracterizaciones referentes a la composición química, por lo que se nos facilita la posibilidad de realizar una comparación con las bases ya establecidas. En el estudio de la composición del aceite esencial de las hojas y espigas de *P. carpunya* de Perú según Vargas, Velasco, Pérez, Palá, and Vallejo (2004) se reportan como componentes mayoritarios a: α -terpinene (9.8%), p-cymene (7.7%), 1,8-cineole (30.2%) y safrole (32.0%). De manera similar en el trabajo de fin de titulación de Erika Castillo (2014) se reportan una composición química α -terpinene (12,1%), p-cimeno (10,9%), 1,8-cineol (13,0%), safrol (14,9%) y spatulenol (9,8%) los mismo que fueron obtenidos en el aceite esencial obtenido de las hojas del material vegetal de la cuenca amazónica del peru (Castillo Valdéz, 2014). Mientras que en el presente estudio se determinó que los componentes mayoritarios son 1,8-Cineole (26,1%); Safrole (23,6%); Germacrene-D (6,67%); α - Terpinene (6,2%); (Z)- β -Ocimene (6,0%).

La variabilidad de la composición química puede deberse a múltiples criterios por los cuales puede existir una evidente diferenciación en los constituyentes de los aceites esenciales entre los más representativos están el origen del material vegetal, especie y órgano de la especie, condiciones climáticas, método de obtención del aceite entre otros (Agnihotri et al., 2012; K. Ochoa et al., 2012; Pino et al., 2012)

3.5 Actividad Biológica del aceite esencial de *P. carpunya*.

Para determinar la actividad antimicrobiana se emplearon procedimientos estandarizados 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.

3.5.1 Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana.

CMI corresponde a la mínima concentración capaz de inhibir el crecimiento bacteriano en un rango de tiempo correspondiente de 18 a 24 horas post incubación. En la tabla 12 se muestra 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 del aceite esencial frente a 7 cepas bacterianas

Microorganismos	Aceite de <i>P. carpunya</i>			
	PC1	PC2	PC3	Control ^b
	CMI (ug/mL) ^a			
GRAM-NEGATIVAS				
<i>Escherichia Coli</i> (ATCC 25922)	> 10000	> 10000	> 10000	1,953
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 9997	> 5000	> 5000	> 5000	1,953
<i>Salmonella typhimurium</i> (LT2)	> 10000	> 10000	> 10000	1,953
<i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC 27853)	> 10000	> 10000	> 10000	15,625
<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 8427)	> 10000	> 10000	> 10000	3,906
GRAM-POSITIVAS				
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	> 10000	> 10000	> 10000	7,81
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	> 10000	> 10000	> 10000	7,81

^a Concentración mínima inhibitoria

^b Gentamicina.

Fuente. El autor

El género *Piper* debido a sus aplicaciones etnobotánicas, principalmente en aplicaciones como antivirales, antimicóticos y antibacterianos, ha sido objeto de múltiples estudios fitoquímicos y biológicos (Y. Sánchez et al., 2009).

En la tabla 12 se puede visualizar que el aceite esencial de *P. carpunya* no inhibió el crecimiento de las bacterias en ninguno de los ensayos realizados hasta las concentraciones establecidas.

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 inactivo para todas las bacterias. En la literatura no se encontró estudios sobre la actividad antibacteriana del aceite esencial de *P. carpunya* frente a las bacterias utilizadas por lo cual los resultados obtenidos permiten aumentar el conocimiento de del comportamiento de dicho aceite y las posibles pruebas de las aplicaciones prácticas.

Sin embargo existen estudios de diferentes especies del genero *Piper* que muestran indicios de actividad antibacteriana contra *S. aureus*; con CMI entre 16 y 62,5 ug/mL con extractos de *P. porphyrophyllum* y *P. aduncum* (Giraldo Aricapa, 2012).

Pese a que se conoce que existen actividad antibacteriana en otras especies del genero *Piper*, no es posible comparar los resultados obtenidos en la presente investigación puesto que los criterios de evaluación fueron diferentes para los extractos y los aceites esenciales; es importante destacar que especies del mismo género de la *P. carpunya* muestran algún tipo de actividad antibacteriana con algunas de las bacterias estudiadas.

Los datos obtenidos dentro de la bibliografía sugieren que la actividad biológica se puede ver disminuida por la diferencia en las concentraciones, volúmenes utilizados para las pruebas, condiciones para la inoculación y la variación en la composición química propia de las muestras debido al cambio en cada una de las recolecciones(Bruni et al., 2004; Quílez et al., 2010), así se ver reflejado en los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación.

Algunos de los compuestos a los que se les atribuye una acción antibacteriana son: safrol, α-terpineno, α-felandreno, p-cimeno, sabineno, eucaliptol entre otros (Benites et al., 2011; Y. Sánchez et al., 2009); que pese a su presencia en el aceite esencial este no presenta una factor inhibitorio con las especia de bacterias en los que se realizaron los ensayos.

3.6 Actividad Antioxidante del aceite esencial de *P. carpunya*

3.6.1 Método ABTS⁺.

3.6.1.1 Lectura de los estándares TROLOX/BHT.

La evaluación de la capacidad antioxidante de las muestras del aceite esencial de *P. carpunya* a diferentes concentraciones frente al radical ABTS⁺ de los diferentes estándares TROLOX y BHT obtuvimos datos de absorbancia que al sustituirlos en la ecuación 2, descrita dentro de la metodología, nos da como resultado los porcentajes de disminución para cada una de las diferentes concentraciones.

En la tabla 13 se muestran las concentraciones de los estándares y su porcentaje de disminución luego de la reacción con el estándar.

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

DATOS ABTS⁺				
Concentración (ppm)	BHT		TROLOX	
	Absorbancia determinada	Porcentaje de disminución (%)	Absorbancia determinada	Porcentaje de disminución (%)
1000	0,305	72,473	0,35	68,20
800	0,838	24,398	0,59	47,08
600	0,847	23,576	0,61	45,28
450	0,859	22,503	0,74	33,48
300	0,902	18,562	0,85	23,23
150	0,980	11,542	0,93	15,76
25	1,024	7,551	1,03	6,80
0	1,027	7,341	1,05	5,63

Absorbancia de la solución de trabajo: 1,108

Fuente. El autor

3.6.1.2 Lectura de las muestras de aceite esencial.

En la tabla 14 se encuentran los resultados obtenidos de las actividad antioxidante del aceite esencial, en ella se encuentra descrito las concentración a las cuales realizamos las muestras del procedimiento evaluado, la absorbancia registrada y el cálculo de los porcentajes de disminución obtenidos en cada dilución.

Tabla 14. Datos del método ABTS⁺ para el aceite esencial de *P. carpunya*

Aceite			
Concentración (ppm)	Absorbancia Determinada	Porcentaje de Disminución (%)	σ
1000	0,86	22,23	0,006
500	0,95	14,59	0,019
100	1,03	7,22	0,004
50	1,04	6,14	0,003
25	1,07	3,28	0,005
12,5	1,08	2,92	0,001
5	1,09	1,41	0,013
0	1,09	1,29	0,031
Absorbancia de la solución de trabajo: 1,108			
n: 3 repeticiones por concentración.			
σ : Desviación estándar			

Fuente. El autor

Según los resultados observados en la tabla 14 podemos comprobar que el aceite esencial evaluado no posee actividad antioxidante en las concentraciones evaluadas frente el radical ABTS⁺, ya que el porcentaje de disminución a una concentración de 1000 ppm fue de 22,23% valores bajos con respecto al TROLOX y el BHT, ya que los valores esperados deberían ser superiores al 50% de inhibición del radical ABTS⁺.

3.6.2 Método DPPH.

3.6.2.1 Lectura de los estándares TROLOX/BHT.

Para calcular la capacidad antioxidante de la muestra de aceite esencial de *P. carpunya*, mediante el método de radical DPPH, a diferentes concentraciones de los estándares de referencia (TROLOX y BHT), se lograron 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 BHT y TROLOX

DATOS ABTS⁺				
	BHT		TROLOX	
Concentración (ppm)	Absorbancia determinada	Porcentaje de disminución (%)	Absorbancia determinada	Porcentaje de disminución (%)
1000	0,56	49,01	0,41	62,96
800	0,62	43,09	0,44	59,50
600	0,71	35,16	0,52	52,66
450	0,77	30,02	0,53	51,26
300	0,84	23,58	0,56	49,35
150	0,94	14,19	0,59	46,55
25	0,96	12,61	0,60	44,88
0	1,00	9,24	0,65	41,11
Absorbancia de la solución de trabajo: 1,097				

Fuente. El autor

3.6.1.2 Lectura de las muestras de aceite esencial.

En la tabla 16, se encuentran representados los resultados obtenidos de la actividad antioxidante del aceite esencial, también se describen las concentraciones evaluadas, la absorbancia y el cálculo del porcentaje de inhibición obtenido para cada dilución.

Tabla 16. Datos del método DPPH para el aceite esencial de *P. carpunya*.

Aceite			
Concentración (ppm)	Absorbancia Determinada	Porcentaje de Disminución (%)	σ
1000	0,97	12,03	0,007
500	0,97	11,94	0,009
100	0,97	11,15	0,014
50	0,99	10,12	0,034
25	0,99	9,66	0,039
12,5	1,03	6,11	0,008
5	1,03	5,80	0,013
0	1,05	4,22	0,027

Absorbancia de la solución de trabajo: 1,097

n: 3 repeticiones por concentración.
 σ : Desviación estándar

Fuente. El autor

Al evaluar las muestras de aceite esencial de *P. carpunya*, en las concentraciones estipuladas en la metodología y con las cuales se trabajó experimentalmente, el porcentaje de disminución con el método del radical DPPH en ningún caso alcanzo valores superiores al 50%, por lo cual podemos deducir que en las muestras analizadas no se encuentran compuestos que retengan los radicales libres, lo cual puede explicar la baja actividad mostrada en este radical.

Cabe recalcar que, a pesar de las diferencias metodológicas, los resultados obtenidos con los métodos ABTS⁺ y DPPH revelaron que el aceite esencial de *P. carpunya* no presento actividad antioxidante ya que el porcentaje de disminución es bajo con respecto a los controles TROLOX y BHT.

Los resultados obtenidos no permitieron establecer IC₅₀ (concentración eficaz 50) dado que los resultados no superan el 50% de disminución en ninguna de las muestras lo cual demuestra que su actividad antioxidante no es buena.

En la actualidad, no hay reportes que muestran la actividad antioxidante del aceite esencial de *P. carpunya*, sin embargo existen reportes científicos que muestran esta actividad

antioxidante de la familia Piper. La actividad antioxidante del aceite esencial de *P. carpunya* analizada en este trabajo mostró porcentajes de reducción menores al 50% (Martínez, Stashenko, Leyva, & Rios, 2007).

La cantidad tan reducida de compuestos fenólicos en el aceite esencial tiene relación directa con las bajas cantidades o con la no presencia de antioxidantes observadas en esta investigación. Por tanto se puede deducir que los compuestos muy reactivos reducen los radicales más activos, mientras que otros con menor reactividad actúan regenerando los de primera línea (Thomas, 2000).

CONCLUSIONES

- *P. carpunya* posee un valor promedio de humedad relativa de 68,25% y un valor promedio de rendimiento de 0,8 %, los valores de la densidad obtenida es de 0,932 g/cm³, el índice de refracción obtenido en una media de 1,4877 y la actividad óptica es de 3,549°.
- En la composición química del aceite esencial se identificaron 27 compuestos, en la columna DB5-MS se identificaron 27 compuestos con un porcentaje de identificación del 99,066% y en la columna HP-INNOWAX se identificaron 25 compuestos con un porcentaje de identificación de 96,227%, se identificaron 5 compuestos mayoritarios en el aceite esencial de *P. carpunya* los cuales fueron: 1,8-Cineole (26,1%); Safrole (23,6%); Germacrene-D (6,7%); α -Terpinene (6,2%); (Z)- β -Ocimene (6,0%).
- El aceite esencial de *P. carpunya* fue inactivo frente a las cepas bacterianas analizadas a las concentraciones evaluadas.
- El aceite esencial obtenido de *P. carpunya* no presentó actividad antioxidante frente a los métodos ABTS⁺ y DPPH.

RECOMENDACIONES

- Profundizar en estudios posteriores sobre los posibles factores externos que hacen que exista una variación en la composición química cualitativa y cuantitativa del aceite esencial de una especie.
- Diversificar los estudios sobre la especie *P. carpunya* para un análisis de sus componentes químicos y así especificar los beneficios de uso cosmético, farmacéutico, etc.
- Integrar más microorganismos de estudio de interés en salud humana, para la evaluación antimicrobiana.

BIBLIOGRAFIA.

- Adams, R. P. (2007). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/mass Spectroscopy*: Allured Publishing Corporation.
- Agnihotri, S., Wakode, S., & Ali, M. (2012). Essential oil of *Myrica esculenta* Buch. Ham.: composition, antimicrobial and topical anti-inflammatory activities. *Natural product research*, 26(23), 2266-2269.
- Albarracín Montoya, G. C., & Gallo Palma, S. G. (2003). *Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando Piper aduncum (cordoncillo) procedente de la zona cafetera*. Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales.
- Almeida Velasco, G. A., & Suárez Cedillo, S. E. (2014). Estudio de la actividad antimicrobiana y antioxidante del aceite esencial del rizoma de *Renealmia Thyrsoides* Subsp. *Thyrsoides* (Zingiberaceae).
- Andrade, M., Armijos, C., Malagón, O., & Lucero, H. (2009). Plantas medicinales silvestres empleadas por la etnia Saraguro en la Parroquia San Lucas, Provincia de Loja-Ecuador. *Editorial UTPL, Loja-Ecuador*. [Links].
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl 1), 5-16.
- Angulo-Flórez, A. M., Cardona, E., Lozano-Calderón, A. T., Montañez-Pinzón, K. A., & Salcedo-Osorio, A. F. (2014). Introducción a la industria de los aceites esenciales extraídos de plantas medicinales y aromáticas. v. 1: *Aceites esenciales extraídos de las plantas medicinales y aromáticas*.
- Arderiu, X. F. (1998). *Bioquímica clínica y patología molecular. II* (Vol. 2): Reverte.
- Aruoma, O. I., Bahorun, T., & Jen, L.-S. (2003). Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 544(2), 203-215.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Bandoni, A. (2002). Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica, 250p. *Editorial de la Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Argentina*.
- Bedoukian, P. Z. (1967). Perfumery and flavoring synthetics.
- Benites, J., Bravo, F., Rojas, M., Fuentes, R., Moiteiro, C., & Venancio, F. (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.
- Berger, R. G. (2007). *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*: Springer Science & Business Media.
- Bosquez-Molina, E., Bautista-Baños, S., & Morales-López, J. (2009). Aceites esenciales: bioconservadores con alto potencial en la industria alimentaria. *Industria Alimentaria*, 31, 12-24.
- Brooks, G. (2011). *Jawetz, Melnick y Adelberg: microbiología médica (25a)*: McGraw Hill Mexico.
- Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M., . . . Sacchetti, G. (2004). Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.(Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry*, 85(3), 415-421.
- Burbano, S., & Muñoz, C. G. (2003). *Física general*: Editorial Tébar.
- Bustos-Martínez, J. A., Hamdan-Partida, A., Gutiérrez-Cárdenas, M., & México, X. (2006). reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomed*, 17, 287-305.
- Calle, J. (1983). Contribución al estudio de algunas especies de la familia Piperaceae. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 4(1), 47-57.
- Cañigual, S., & Vila, R. (2007). Los aceites esenciales en fitoterapia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6(5), 146.
- Cárdenas-Tello, C., Pozo-Rivera, W., Almirall, E., & Roque, A. (2016). Fitoquímica de extractos de *Ocotea quixos* y *Piper carpunya*, potenciales fungocontroladores. *Qualitas*, 11, 56-83.
- Castañeda, B. C., Llica, E. R., & Vasquez, L. I. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Horizonte Médico*, 8(1).
- Castillo Valdéz, E. Y. (2014). *Estudio pre-clínico de la guaviduca (Piper carpunya) de propiedades y efecto antiulceroso en ratas wistar*. Universidad Técnica de Machala.
- Celis, Á., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., & Cuca, L. E. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 97.
- Conde, C. G., Rueda, X. Y., & Patiño, G. G. S. (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1), 12-23.

- Cornelli, U. (2009). Antioxidant use in nutraceuticals. *Clinics in dermatology*, 27(2), 175-194.
- Costa Batllorí, P. (2004). *Antioxidantes naturales en la alimentación animal*. Paper presented at the Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias.
- de Ercilla, S. B., & Muñoz, C. G. (2003). *Física general*: Editorial Tébar.
- Díaz Pérez, M., Rodríguez Martínez, C., & Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 48(2), 147-161.
- Dorman, H., & Deans, S. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.
- Dudareva, N., & Pichersky, E. (2006). *Biology of floral scent*: CRC Press.
- Elechosa, M. A. M. A. (2009). Manual de recolección sustentable de plantas aromáticas nativas de la región central y noroeste de la Argentina: INTA.
- Fernández, P. B., Capó, J. T., Cofiño, G. M., Domínguez, C. C., Menéndez, A. B., & Alarcón, C. M. (2009). Actividad expectorante de formulaciones a partir de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng (orégano francés). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14(2).
- Gallardo, F., Soto, S., Vila, J., de Anta Losada, M. T. J., & Ruiz, J. (2003). Distintos mecanismos de resistencia asociados a integrones en aislamientos clínicos de *Salmonella typhimurium*. *Revista Espanola de Quimioterapia*, 16(4), 398-402.
- García Bacallao, L., Rojo Domínguez, D. M., García Gómez, L. V., & Hernández Ángel, M. (2002). Plantas con propiedades antiinflamatorias. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 21(3), 214-216.
- Giraldo Aricapa, A. (2012). Estudio fitoquímico de *Piper pesaesatum* y *Piper crassinervium* (Piperaceae).
- Gutiérrez Bouzán, M., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. Gutiérrez, MC; Droguet, M." *La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor*". *Boletín Intexter*, juliol 2002, núm. 122, p. 35-41.
- Harris, D. C. (2006). *Análisis químico cuantitativo*: Reverté.
- Haynes, W. M. (2014). *CRC handbook of chemistry and physics*: CRC press.
- Hernández, A. Q. (2016). Las plantas medicinales. *Biocenosis*, 21(1-2).
- Hernández Díaz, L., & Rodríguez Jorge, M. (2001). Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en Cuba. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 6(2), 44-47.

- 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(7), 1027-1031.
- Jay, J. M. L., Golden, M. J., Jay, D. A. J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A., Lerda, D. E., . . . Silvestre, A. A. (2005). *Microbiología moderna de los alimentos/Modern food microbiology*. Organización Panamericana de la Salud.
- Jørgensen, P. M., & León-Yáñez, S. (1999). Catálogo de las plantas vasculares del Ecuador. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 75, 1-1181.
- Juarez Bernal, B. S., & Lopez Martinez, L. X. (2014). Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos acuosos y etanólicos de diversas variedades de maíz del estado de México, sobre ABTS•+ y peróxido de hidrógeno como especie reactiva de oxígeno.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology (Campinas)*, 25(4), 726-732.
- Lahlou, S., Figueiredo, A. F., Magalhães, P. J. C., & Leal-Cardoso, J. H. (2002). Cardiovascular effects of 1, 8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 80(12), 1125-1131.
- Leyva, M., Tacoronte, J. E., Marquetti, M. d. C., Scull, R., Montada, D., Rodríguez, Y., & Yirian Bruzón, R. (2008). Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas en larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 60(1), 0-0.
- Lizcano, A., & Vergara, J. (2008). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o Aceites Esenciales de las especies vegetales, *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógeno. Trabajo de grado (Microbiología Industrial): Bogotá DC: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Carrera de Microbiología Industrial. *Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá DC–Colombia*.
- Margulis, L., & Sagan, D. (2012). El proceso de nutrición en las plantas., from <http://assets.mheducation.es/bcv/guide/capitulo/8448180895.pdf>

- Martínez, A. (2001). *Aceites Esenciales* Facultad de Química Farmacéutica, <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf>.
- Martínez, J. R., Stashenko, E., Fernández, O. D., Bottia, E. J., & Mendivelso, D. I. (2007). Comparación de la composición química de los metabolitos secundarios volátiles de cuatro plantas de la familia piperaceae obtenidos por destilación extracción simultánea. *Scientia Et Technica*, 1(33), 193-195.
- Martínez, J. R., Stashenko, E., Leyva, M. A., & Rios, A. G. (2007). Determinación de la composición química y actividad antioxidante in vitro del aceite esencial de piper auritum kunth (piperaceae) difundida en la costa colombiana. *Scientia Et Technica*, 1(33), 439-442.
- Mendoza, Z. A., Linares-Palomino, R., & Kvist, L. P. (2006). Especies leñosas y formaciones vegetales en los bosques estacionalmente secos de Ecuador y Perú. *Arnaldoa*, 13(2), 324-350.
- Molares, S., González, S., Ladio, A., & Castro, M. A. (2009). Etnobotánica, anatomía y caracterización físico-química del aceite esencial de Baccharis obovata Hook. et Arn.(Asteraceae: Astereae). *Acta Bot Bras*, 23(2), 578-589.
- Mollinedo Patzi, M. A., & Gonzáles Villalobos, C. (2014). Bacterias Gram Negativas. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, 49, 2609.
- Muñoz, F. (1996). *Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado*: Mundi-Prensa Libros.
- Muñoz, O., Montes, M., & Wilkomirsky, T. (2001). *Plantas medicinales de uso en Chile: Química y Farmacología*: Editorial Universitaria.
- Nathaly, A. G. A. (2016). *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.*, Universidad Técnica Particular de Loja Loja.
- Ochoa, C. I., & Ayala, A. A. (2011). Los flavonoides: apuntes generales y su aplicación en la industria de alimentos.
- Ochoa, K., Paredes, L., Bejarano, D., & Silva, R. (2012). Extraction, characterization and evaluation of antibacterial activity of essential oil of Senecio graveolens Wedd (Wiskataya). *Scientia Agropecuaria*, 3(4), 291-302.
- Pahissa, A. (2009). Infecciones producidas por Staphylococcus aureus: Barcelona-España. Panamericana.

- Parr, A. J., & Bolwell, G. P. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 985-1012.
- Parra, J. E., Delgado, W. A., & Cuca, L. E. (2011). Cumanensic acid, a new chromene isolated from Piper cf. cumanense Kunth.(Piperaceae). *Phytochemistry Letters*, 4(3), 280-282.
- Patzelt, E., & Echeverría, M. (1996). *Flora del Ecuador*. Banco Central del Ecuador Quito.
- Pavas, E. G., & Vega, A. S. (2012). Evaluación a escala de planta piloto del proceso industrial para la obtención de aceite esencial de cardamomo, bajo la filosofía “cero emisiones. *Cuadernos de Investigación*(30).
- Peñalver, M. (2004). Las plantas medicinales. *Rev Cubana Oncol*, 16(1), 66.
- Pino, O., Sánchez, Y., Rojas, M. M., Abreu, Y., & Correa, T. M. (2012). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de Pimpinella anisum L. *Revista de Protección Vegetal*, 27(3), 181-187.
- Quílez, A., Berenguer, B., Gilardoni, G., Souccar, C., De Mendonça, S., Oliveira, L., . . . Vidari, G. (2010). Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-Helicobacter pylori activities of several fractions isolated from Piper carpunya Ruiz & Pav. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(3), 583-589.
- Ramirez, J., Cartuche, L., Morocho, V., Aguilar, S., & Malagon, O. (2013). Antifungal activity of raw extract and flavanons isolated from Piper ecuadorensis from Ecuador. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(2), 370-373.
- Ramos-García, M. d. L., Bautista-Baños, S., Barrera-Necha, L. L., Bosquez-Molina, E., Alia-Tejagal, I., & Estrada-Carrillo, M. (2010). Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(1), 44-57.
- Reddy, S. V., Srinivas, P. V., Praveen, B., Kishore, K. H., Raju, B. C., Murthy, U. S., & Rao, J. M. (2004). Antibacterial constituents from the berries of Piper nigrum. *Phytomedicine*, 11(7), 697-700.
- Riofrío Quezada, J. Á. (2012). *Aislamiento, caracterización y actividad antifúngica de metabolitos secundarios a partir de Piper carpunya Ruiz & Pav. Memoria para optar al Título de Bioquímico Farmacéutico*. Universidad Técnica Particular de Loja Retrieved from cepra.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/4261/1/JIMMY_RI.PDF.
- Rodríguez-Álvarez, M., Alcaráz-Meléndez, L., & Real-Cosío, S. (2012). Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. *Centro de*

- Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC La Paz, Baja California Sur, México, 24-29.*
- Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *salud pública de méxico, 44(5)*, 464-475.
- Rojano, B., Gaviria, C., Gil, M., Saez, J., Schinella, G., & Tournier, H. (2008). Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios. *Vitae, 15(1)*, 173-181.
- Romero Cabello, R. R. R. C. (2007). *Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias.*
- Rosas, A. (2004). Nuevas fuentes de antioxidantes naturales. *por Rosas A, CYTED y MCT. Versión en CD.*
- Rueda, X. Y., & Mogollón, O. F. C. (2013). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* de tres zonas de Pamplona (Colombia). *BISTUA REVISTA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS, 10(1)*.
- Ruiz, V. A., & Guillén, S. M. (2006). *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y Microbiología clínica*: Ed. Médica Panamericana.
- Sánchez, M. F. O. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*: aiyana ediciones.
- Sánchez, Y., Pino, O., Correa, T. M., Naranjo, E., & Iglesia, A. (2009). Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (caisimón de anís). *Revista de Protección Vegetal, 24(1)*, 39-46.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*: Convenio Andrés Bello.
- Skoog, D. A., Holler, F., Stanley, R. D. A., Aucejo, M., Estellés, A., Hernández, M. H., . . . Alonso, S. (2008). *Principios de análisis instrumental*: Cengage Learning.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (1998). Principios de análisis instrumental. *Ed. McGraw Hill, 5ta Edición, 2001, ISBN, 217660172.*
- Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica, 2(1)*, 29-47.
- Tene, V., Malagón, O., Finzi, P. V., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology, 111(1)*, 63-81.
- Thomas, M. J. (2000). The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition, 16(7)*, 716-718.

- Thormar, H. (2011). *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*: Wiley Online Library.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*: Ed. Médica Panamericana.
- Trabadela, C., Sánchez-Fidalgo, S., Miño, P., Berenguer, B., Quilez, A., de la Puerta, R., & Martín, M. (2008). Gastroprotective effects of *Piper carpunya* against diclofenac-induced gastric lesions in rats. *Pharmaceutical Biology*, 46(12), 829-837.
- Vargas, L., Velasco, A., Pérez, M. J., Palá, J., & Vallejo, M. C. G. (2004). Essential oil composition of the leaves and spikes of *Piper carpunya* Ruiz et Pavon (Piperaceae) from Peru. *Journal of Essential Oil Research*, 16(2), 122-123.

ANEXOS

Anexo 1

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:

$$Hm = \frac{(m1 - m2)}{(m1 - m)} * 100$$

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 2

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 la siguiente fórmula:

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

Dónde:

R: % de Rendimiento.

V: Volumen del aceite esencial extraído en mL.

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

Anexo 3

DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA A 20OC

(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 20OC de un aceite esencial se define como la masa de un determinado volumen de aceite esencial a 20OC sobre la masa de un volumen igual de agua destilada a 20OC.

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 20OC es de 0.0007 a 0.0008 por grado centígrado.
- La masa volumétrica a 20OC de un aceite esencial se reporta como la masa de un cierto volumen del aceite esencial a 20OC.

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_{2020} se la expresa con la siguiente fórmula:

$$d_{2020} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Dónde:

d_{2020} : 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 4

DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

PRINCIPIO:

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

DEFINICIÓN:

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

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

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

APARATOS:

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

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

1.3330 para agua destilada.

1.4906 para el p-cimeno.

1.5685 para el benzoato de bencilo.

1.6585 para el 1-bromo naftaleno.

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

MODO DE OPERACIÓN:

Determinación

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

$$n_D^t = n_D^{t'} + 0,0004(t' - t)$$

Dónde:

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

F = factor de corrección (0.0004)

t' = temperatura a la que se efectuó la lectura

t = temperatura a 20°C

Nota:

Expresar los resultados con cuatro cifras decimales.

La precisión de la determinación es de ± 0.0002 .

Anexo 5

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: α_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 $+604\text{ mrad}$ 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:

$$\alpha'D = \frac{A}{l} * 100$$

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

l = 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:

$$[\alpha] = \alpha' \frac{D}{C}$$

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 que se muestra a continuación para obtener la actividad óptica calculada.

$$\alpha = (\alpha l * c) - \alpha s$$

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 6

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS INDICE DE RETENCION DE KOVATS ARITMETICO

^a ref.1; ^b ref. 2; ^c ref.3; ^d ref. 4; ^e ref. 5; ^f ref. 6; ^g ref. 7; ^h ref. 8; ⁱ ref. 9; ^k ref.10; ^l ref. 11; ^m ref. 12; ⁿ ref. 13; ^o ref. 14; ^p ref. 15; ^q ref. 16.

1. Adams, R. P., Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation: 2007.
2. Frizzo, C.; Serafini, L.; Dellacassa, E.; Lorenzo, D.; Moyna, P., Essential oil of *Baccharis uncinella* DC. from Southern Brazil. *Flavour and fragrance journal* 2001, 16 (4), 286-288.
3. Kundakovic, T.; Fokialakis, N.; Kovacevic, N.; Chinou, I., Essential oil composition of *Achillea lingulata* and *A. umbellata*. *Flavour and fragrance journal* 2007, 22 (3), 184-187.
4. Tabanca, N.; Demirci, B.; Ozek, T.; Kirimer, N.; Baser, K. H. C.; Bedir, E.; Khan, I. A.; Wedge, D. E., Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of essential oils from *Pimpinella* species gathered from Central and Northern Turkey. *Journal of Chromatography A* 2006, 1117 (2), 194-205.
5. Feng, T.; Cui, J.-j.; Xiao, Z.-b.; Tian, H.-x.; Yi, F.-p.; Ma, X., Chemical composition of essential oil from the peel of Chinese *Torreya grandis* fort. *Organic Chemistry International* 2011, 2011.
6. Formisano, C.; Rigano, D.; Napolitano, F.; Senatore, F.; Apostolides Arnold, N.; Piozzi, F.; Rosselli, S., Volatile constituents of *Calamintha origanifolia* Boiss. growing wild in Lebanon. *Natural Product Communications* 2007, 2 (12), 1253-1256.
7. Couladis, M.; Tzakou, O.; Stojanovic, D.; Mimica-Dukic, N.; Jancic, R., The essential oil composition of *Salvia argentea* L. *Flavour and fragrance journal* 2001, 16 (3), 227-229.
8. Viljoen, A.; Van Vuuren, S.; Ernst, E.; Klepser, M.; Demirci, B.; Başer, H.; Van Wyk, B.-E., *Osmitopsis asteriscoides* (Asteraceae)-the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. *Journal of Ethnopharmacology* 2003, 88 (2), 137-143.

9. Werkhoff, P.; Güntert, M.; Krammer, G.; Sommer, H.; Kaulen, J., Vacuum headspace method in aroma research: flavor chemistry of yellow passion fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998, 46 (3), 1076-1093.
10. Lee, S.-J.; Umamo, K.; Shibamoto, T.; Lee, K.-G., Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry* 2005, 91 (1), 131-137.
11. Vinogradov, B. A., Production, composition, properties and application of essential oils. 2004.
12. Kaya, A.; Baser, K.; Tuemen, G.; Koca, F., The essential oil of *Acinos suaveolens* (Sm.) G. Don fil. *Acinos arvensis* (Lam.) Dandy and *Acinos rotundifolius* Pers, growing wild in Turkey. *Flavour and fragrance journal* 1999, 14 (1), 60-64.
13. Choi, H.-S., Character impact odorants of Citrus Hallabong [(*C. unshiu* Marcovx *C. sinensis* Osbeck)x *C. reticulata* Blanco] cold-pressed peel oil. *Journal of agricultural and food chemistry* 2003, 51 (9), 2687-2692.
14. Tunalier, Z.; Kirimer, N.; Başer, K. H. C., Wood Essential Oils of *Juniperus foeticissima* Willd. *Holzforchung* 2003, 57 (2), 140-144.
15. Lopes, D.; Strobl, H.; Kolodziejczyk, P., 14-Methylpentadecano-15-lactone (Muscolide): A New Macrocyclic Lactone from the Oil of *Angelica archangelica*L. *Chemistry & biodiversity* 2004, 1 (12), 1880-1887.
16. Başer, K.; Demirci, B.; Kirimer, N. e.; Satil, F.; Tümen, G., The essential oils of *Thymus migricus* and *T. fedtschenkoi* var. *handelii* from Turkey. *Flavour and fragrance journal* 2002, 17 (1), 41-45.