



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Determinación de las propiedades físicas, composición química, evaluación de la actividad biológica y antioxidante del aceite esencial de la especie *Annona cherimola* (chirimoya) del cantón Cariamanga de la provincia de Loja.

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTOR: Ludeña González, Jeannette Isabel

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

Ph.D.

Benito Eduardo Valarezo Valdez.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: “**Determinación de las propiedades físicas, composición química, evaluación de la actividad biológica y antioxidante del aceite esencial de la especie *Annona cherimola (chirimoya)* del cantón Cariamanga de la provincia de Loja**”, realizada por Jeannette Isabel Ludeña González, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja.....

F.....

DECLARACION DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Jeannette Isabel Ludeña González declaro ser autora del presente trabajo de titulación: **“Determinación de las propiedades físicas, composición química evaluación de la actividad biológica y antioxidante del aceite esencial de la especie *Annona cherimola* (*chirimoya*) del cantón Cariamanga de la provincia de Loja”**, de la titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Benito Eduardo Valarezo Valdez director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de exclusiva responsabilidad.

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

f) _____

Jeannette Isabel Ludeña González

1104890114

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo de investigación a mis padres Wilber e Isabel, quienes han sido un apoyo incondicional durante mi tiempo como estudiante, ellos han sido la mayor inspiración de superación, esfuerzo, dedicación que podido tener, le agradezco a Dios por haberme regalo a estos dos seres maravillosos como padres, yo he visto el sacrificio puesto en mí, la paciencia y el amor que han sabido brindarme incondicionalmente. Los amo y siempre les estaré agradecida por haberme convertido en la mujer que ahora soy, un reflejo de ustedes.

Jeannette Ludeña

AGRADECIMIENTO

“Saber vivir es hacer lo mejor que podemos con lo que tenemos en el momento que estamos”.

Agradezco a Dios quien ha sido mi guía, compañía y protector en cada uno de los momentos buenos y malos de mi vida como estudiante.

Agradezco a la Universidad Técnica Particular de Loja y al Ing. Eduardo Valarezo por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación de aceites esenciales, por los conocimientos, la paciencia brindada.

Agradezco a mi mama por ser esa mujer maravillosa y un ejemplo de que a pesar de los retos que se nos puedan presentar uno nunca debe darse por vencido, y a mi papa por demostrarme que si trabajas duro las recompensas son grandes.

Gracias Ary por no ser solo mi hermana sino mi mejor amiga que junto con Juanito un lindo amigo y excelente cuñado, me dieron el regalo de ser tía de un ser tan hermoso como lo es José Miguel.

Gracias a mis amig@s que tuve el agrado de encontrar en mi tiempo como estudiante, gracias por las risas, las locuras, las aventuras vividas, siempre los llevare en mi corazón.

INDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	I
DECLARACION DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	II
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTO	IV
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO I	
MARCO TEORICO.....	5
1.1. Aceites esenciales.....	6
1.1.1. Clasificación de los aceites esenciales.....	6
1.1.2 Extracción.....	7
1.1.3 Caracterización.....	8
1.1.4 Propiedades.	9
1.1.5. Usos y aplicaciones.....	9
1.2. Cromatografía de gases.....	10
1.3. Actividad biológica.....	13
1.3.1. Bacterias.....	13
1.4. Actividad antioxidante.	17
1.4.1. Método ABTS (2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).....	18
1.4.2. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).	18
1.5. Plantas medicinales.	18
1.6. Flora ecuatoriana.	19

1.6.1. Flora aromática del Ecuador.....	20
1.7. La familia <i>Annonaceae</i>	20
1.7.1. El género <i>Annona</i>	21
CAPITULO II	
MATERIALES Y MÉTODOS	24
2.1. Metodología.....	25
2.1.1. Recolección de la materia vegetal.....	26
2.1.2. Extracción del aceite esencial.....	27
2.1.3. Determinación de las propiedades físicas.....	29
2.1.4. Determinación de la composición química del aceite esencial.....	31
2.1.5. Determinación de la actividad biológica del aceite esencial de <i>Annona cherimola</i>	39
2.1.6. Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial del fruto de <i>Annona cherimola</i>	43
CAPITULO III	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
3.1. Recolección del material vegetal.....	¡Error! Marcador no definido.
3.2. Extracción del aceite esencial de <i>Annona cherimola</i>	51
3.3 Propiedades Físicas.....	51
3.3.1 Determinación del porcentaje de humedad de las hojas de <i>Annona cherimola</i>	51
3.3.2. Rendimiento del aceite esencial.....	52
3.3.3. Densidad relativa del aceite esencial.....	53
3.3.4. Índice de refracción del aceite esencial.....	53
3.3.5. Actividad óptica específica del aceite esencial.....	54
3.4. Composición Química del aceite esencial de <i>Annona cherimola</i>	55
3.4.1. Análisis cualitativo y cuantitativo.....	55
3.5. Actividad biológica del aceite esencial de <i>Annona cherimola</i>	65
3.5.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana.....	65
3.6. Actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Annona cherimola</i>	67

3.6.1. Método ABTS+.....	67
3.6.2. Método DPPH.....	68
CONCLUSIONES.....	71
RECOMENDACIONES.....	72
BIBLIOGRAFÍA.....	73
ANEXOS.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la Clasificación de los aceites esenciales.....	7
Figura 2. Sistema de cromatografía de gases: a) aire, b) nitrógeno, c) helio, RF; regulador de flujo.....	12
Figura 3: Detector de ionización de flama.....	12
Figura 4: <i>Staphylococcus Aureus</i>	14
Figura 5: <i>Escherichia coli</i>	15
Figura 6: Salmonella entérica. (A) Tinción Gram; (B) Flagelación períttrica.....	16
Figura 7: Especie <i>Annona cherimola</i>	23
Figura 8: Esquema del desarrollo de la investigación.....	25
Figura 9: Área de recolección de la especie <i>Annona cherimola</i>	26
Figura 10: Muestra recolectada (hojas de <i>Annona cherimola</i>).....	27
Figura 11: Equipo de extracción del aceite esencial.....	28
Figura 12: Recolección del aceite esencial.....	28
Figura 13: Recolección del aceite esencial.....	29
Figura 14: Equipos para la determinación de la humedad del aceite esencial.....	30
Figura 15: Polarímetro digital.....	31
Figura 16: Cromatógrafo de gases.....	33
Figura 17: Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna no polar (DB-5MS).....	34
Figura 18: Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna polar (HP-INNOWAX).....	35
Figura 19: Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna no polar (DB-5MS) acoplada a un detector de ionización de llama (FID).....	37
Figura 20: Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna polar HP-INNOWAX acoplada a un detector de ionización de llama (FID).....	38
Figura 21: Dilución de aceite esencial y solvente.....	40
Figura 22: Modelo de Microplaca IC96 para bacterias con las concentraciones de aceite ($\mu\text{g/mL}$).....	42
Figura 23: Espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS Scanning 333907.....	44
Figura 24: Diluciones para la actividad antioxidante.....	44
Figura 25: Muestras del aceite esencial de <i>Annona cherimola</i> analizadas mediante el método ABTS+.....	47
Figura 26: Muestras del aceite esencial de <i>Annona cherimola</i> analizadas mediante el método DPPH.....	48
Figura 27: Fórmula utilizada para calcular porcentaje de inhibición. A: Absorbancia del blanco. A1: Absorbancia de la muestra.....	49
Figura 28: Perfil cromatográfico del aceite esencial de <i>Annona cherimola</i> (A) columna no polar (DB5-ms); (B) columna polar (HP-Innowax).....	58
Figura 29: Compuestos mayoritarios en la columna no polar (DB5-ms).....	60
Figura 30: Compuestos mayoritarios en la columna no polar (HP-Innowax).....	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características taxonómicas de <i>Annona cherimola</i>	23
Tabla 2: Microorganismos de prueba.....	39
Tabla 3: Medios de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada bacteria.....	41
Tabla 4: Volumen necesario para dilución en aceite.....	45
Tabla 5: Volumen necesario para cada dilución en Trolox.....	46
Tabla 6: Cantidad (mL) de aceite esencial extraído de cada recolección de <i>Annona cherimola</i>	51
Tabla 7: Porcentaje de humedad en la <i>Annona cherimola</i>	51
Tabla 8: Rendimiento en % v/p del aceite esencial de las hojas de <i>Annona cherimola</i>	52
Tabla 9: Densidad relativa del aceite esencial de <i>Annona cherimola</i>	53
Tabla 10: Índice de refracción del aceite esencial <i>Annona cherimola</i>	54
Tabla 11: Actividad óptica del aceite esencial de <i>Annona cherimola</i>	54
Tabla 12: Composición Química del aceite esencial de la especie <i>Annona cherimola</i>	58
Tabla 13: Comparación de la cantidad relativa (%) de los compuestos químicos del aceite esencial por CG-EM y CG-FID.....	63
Tabla 14: CMI antibacteriana ($\mu\text{g/ml}$) del aceite esencial frente a 7 cepas bacterianas.....	66
Tabla 15: Datos del método ABTS+ para el estándar TROLOX.....	67
Tabla 16: Datos del método ABTS+ para el aceite esencial.....	68
Tabla 17: Datos del método DPPH para el estándar TROLOX.....	69
Tabla 18: Datos del método DPPH para el aceite esencial.....	70

RESUMEN

Annona cherimola, más conocida como chirimoya, es una planta aromática caracterizada por la presencia de numerosas sustancias bioactivas de diversa naturaleza química y por su actividad insecticida y antiparasitaria. El aceite esencial de esta planta fue extraído por destilación. Su composición química se determinó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas CG/EM y al detector de ionización de llama CG/FID. La actividad biológica se evaluó por el método de microdilución en caldo, expresada como la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la actividad antioxidante por medio de dos métodos espectrofotométricos ABTS⁺ y DPPH. Así mismo se determinaron las propiedades físicas del aceite esencial. Se identificaron 30 compuestos que representan el 94,05 % del aceite esencial, sus compuestos mayoritarios son: Germacrene D (21,83 %); Sabinene (8,94 %); β -Elemene (7,99 %); Bicyclogermacrene (6,22 %). La densidad del aceite fue de 0.9472 g/cm³, índice de refracción: 1.4713 y actividad óptica de -61. 84°. En cuanto a la actividad biológica del aceite esencial resulto ser inactiva tanto para las bacterias Gram-negativas como Gram-positivas utilizadas en este estudio. El aceite esencial presentó actividad antioxidante con un porcentaje de disminución de 89,57 % para ABTS⁺ y para DPPH de 99.91 %.

Palabras claves: *Annona cherimola*, Aceite esencial, Cromatografía de gases, Concentración Mínima Inhibitoria, Actividad biológica, Actividad antioxidante.

ABSTRACT

Annona cherimola. Known as cherimoya, is an aromatic plant characterized by the presence of numerous bioactive substances of various chemical nature and by its insecticidal and antiparasitic activity. The essential oil of this plant was extracted by distillation. Its chemical composition was determined by gas chromatography coupled to CG / EM mass spectrometry and the CG / FID flame ionization detector. The biological activity was evaluated by the broth microdilution method, expressed as the minimum inhibitory concentration (MIC) and the antioxidant activity by two spectrophotometric methods ABTS + and DPPH. Likewise the physical properties of the essential oil were determined. It was identified 30 compounds that represent 94.05 % of the essential oil, its main compounds are: Germacrene D (21,83 %); Sabinene (8.94 %); B-Elemene (7.99 %); Bicyclogermacrene (6.22 %). The density of the oil was 0.9472 g / cm³, refractive index: 1.4713 and optical activity of -61. 84°. As for the biological activity of the essential oil it turned out to be inactive for both Gram-negative and Gram-positive bacteria used in this study. The essential oil showed antioxidant activity with a percentage of decrease of 89.57 % for ABTS + and for DPPH of 99.91 %.

Key words: *Annona cherimola*, Essential oil, Gas chromatography, Minimum Inhibitory Concentration, 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 *Annona cherimola* del cantón Cariamanga de la provincia de Loja. Se desarrolla en 3 capítulos, el primer capítulo titulado Marco Teórico trata sobre el estado del arte de este 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 exponen y analizan los resultados. Esta investigación contribuirá al estudio de la flora aromática de la Región Sur del Ecuador y específicamente al proyecto “Evaluación de la flora aromática de la Provincia Loja” que se desarrolla en la Sección de Ingeniería de Proyectos 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 es también alimentada en el Catálogo de Plantas Aromáticas. Una vez conocida la composición química, propiedades físicas y actividad biológica y antioxidante 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 *Annona cherimola*. 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 *Annona cherimola*. y el de contribuir al desarrollo de nuevos estudios sobre *Annona cherimola*. 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 determino 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/MS 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 cfu/mL para bacterias Gram-negativas [*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC9997), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Escherichia coli* (ATCC

25922), *Salmonella typhimurium* (LT2), *Salmonella enterica*] y bacterias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). La actividad antioxidante fue evaluada mediante dos métodos espectrofotómetros: capacidad de atrapamiento del catión-radical +ABTS y DPPH.

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

1.1 Aceites esenciales.

Los aceites esenciales se forman a partir de mezclas naturales de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas. Encontrándose muy difundidos en el reino vegetal, de las 295 familias de plantas, de 60 a 80 producen aceites esenciales. Las principales plantas que contienen aceites esenciales, corresponden a familias como: compuestas, labiadas, lauráceas, mirtáceas, rosáceas, rutáceas, umbelíferas, pináceas y annonáceas (Sena, 2011). Estas sustancias son extraídas a través de arrastre a vapor y sus componentes son utilizados por las industrias de productos naturales, aromaterapia, etc. El rendimiento del aceite esencial en las plantas varía según las especies y oscila entre el 0,01 y el 2%, calculado sobre el peso de hierba fresca destilada.

La mayoría de los aceites esenciales, pueden ser hallados en diferentes partes de la planta, tales como hojas (eucalipto, naranjo, romero, chirimoya), raíces, corteza (canela, sándalo, etc.), flores (rosas, jazmín, etc.), corteza del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.), en los frutos (anís, hinojo, etc.). Estos aceites esenciales están constituidos químicamente por terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, etc.) Y fenilpropanoides, compuestos que son volátiles y por lo tanto fácilmente arrástrables por vapor de agua (Paredes Punina & Quinatoa Chicaiza, 2010).

Los aceites esenciales son los principales constituyentes del aroma y sabor de las especies, además presentan la propiedad de inhibir el crecimiento microbiano, actuando como agentes bacteriostáticos o antifúngicos. Otra propiedad funcional de los aceites esenciales es la de actuar como antioxidantes, retrasando o inhibiendo la oxidación de aceites y lípidos en general (Peredo Luna, Palou García, & López Malo, 2009).

1.1.1. Clasificación de los aceites esenciales.

En la Figura 1. se establece la clasificación de los aceites esenciales teniendo en cuenta diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.



Figura 1. Esquema de la Clasificación de los aceites esenciales.

Fuente: La Autora

1.1.2 Extracción.

Según la diversidad del material vegetal, parte de la planta a emplear y estabilidad del aceite esencial que se pretenda obtener, se emplean diversos de extracción, donde su correcta aplicación será lo que determine la calidad del producto final. Los aceites esenciales se pueden extraer mediante diferentes métodos como:

1. Arrastre con vapor: el cual se lleva a cabo con un vapor seco sobrecalentado, generado usualmente por una caldera, que penetra el material vegetal a presión más alta que la atmosférica, la corriente de vapor rompe las células o canales oleíferos en la planta y arrastra la mezcla volátil, que se condensa luego de atravesar un refrigerante. El método de arrastre con vapor se usa para extraer aceites de rizomas, raíces y de hojas secas o fermentadas de algunas plantas.
2. Destilación con agua-vapor: en este sistema de extracción se emplea un vapor húmedo, proveniente del agua en ebullición, que traspasa el material vegetal suspendido encima y apoyado sobre una malla. La mayoría de plantas herbáceas se destilan por este método.
3. Hidrodestilación es un proceso cuando el material vegetal se sumerge directamente al agua, que se calienta a hervor. Este método se usa para la destilación del material vegetal delicado, por ejemplo, flores (Stashenko, 2009).

1.1.3 Caracterización

1.1.3.1. Características físicas.

La caracterización física de los aceites esenciales es muy importante para determinar el rendimiento del mismo, usando la relación existente entre el volumen del aceite esencial obtenido y la masa de la muestra vegetal. Además, las propiedades físicas de los aceites esenciales son su olor pronunciado y penetrante, en general, constituyen del 0,1 al 1% del peso seco de la planta. Son líquidos con escasa solubilidad en agua, solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos. Cuando están frescos, a temperatura ambiente, son incoloros, ya que al oxidarse se resinifican y toman un color amarillento oscuro (lo que se previene depositándolos en recipientes de vidrio de color topacio, totalmente llenos y cerrados perfectamente). La mayoría de los aceites son menos densos que el agua (salvo excepciones como los aceites esenciales de canela, sazafrán y clavo) y con un alto índice de refracción (López Luenco, 2004).

Estos aceites esenciales son volátiles, lo que significa que pasan fácilmente del estado líquido al estado gaseoso a temperatura ambiente o algo mayor; son ópticamente activos; de peso específico de 0,8 a 2,0 a temperatura de 15 °C; con punto de ebullición de 150 a 300 °C; índice de refracción de 1,45 a 1,5. Incluso, se alteran fácilmente bajo la acción de la luz, tornándose oscuros y modificando su perfume (Montoya Cadavid, 2010).

1.1.3.2. Características químicas.

Ya que los aceites esenciales son una parte del metabolismo de las plantas, su composición química varía permanentemente, cambiando las proporciones de sus constituyentes o transformando unos en otros, según sea la parte de la planta en el momento de su desarrollo o en el momento del día en que fue recolectada la planta. La proporción de los componentes de la mezcla varía de un aceite a otro, es decir, cada aceite esencial tiene su propia mezcla característica de compuestos con variaciones cualitativas y cuantitativas definidas. Algunos pueden ser tan simples como el aceite de canela formado en un 85% de sólo cinamaldehído, o tan complejas como el de jazmín, o el de manzanilla con cerca de 130 compuestos. Se hace una discriminación entre los compuestos contenidos en una esencia, y se habla entonces de compuestos mayoritarios cuando los compuestos están presentes en la esencia en una proporción mayor al 1 ó 0,5% (Navarrete, Gil, Durango, & Garcia, 2009).

En los aceites esenciales se encuentran compuestos que pertenecen a la familia de los hidrocarburos como: alifáticos, aromáticos, monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos que son los compuestos que se hallan en mayor cantidad (compuestos mayoritarios), y se encuentran en forma libre. Los componentes de los aceites se clasifican en:

- **Alcoholes:** mentol, bisabolol, linalol
- **Fenoles:** timol, carvacrol
- **Aldehídos:** geranial, citral, aldehído benzoico, aldehído cinámico
- **Cetonas:** alcanfor, thuyona
- **Ésteres:** acetato de bornilo, acetato de linalilo, salicilato de metilo, compuesto antiinflamatorio parecido a la aspirina).
- **Peróxidos:** ascaridol
- **Hidrocarburos terpénicos:** terpenos y terpenoides (Navarro Beltrán, 2012)

1.1.4 Propiedades.

En la naturaleza, los aceites esenciales desempeñan un papel importante en la protección de las plantas como agentes antibacterianos, antivirales, antifúngicos, insecticidas y actúan contra los herbívoros, reduciendo su apetito por estas plantas. También pueden atraer algunos insectos para ayudar con la dispersión de polen y semillas. Los aceites esenciales o algunos de sus componentes son utilizados en la producción de perfumes, productos de maquillaje, productos sanitarios, en odontología, en la agricultura, como conservantes y aditivos de alimentos, etc. Existen ciertos aceites esenciales que parecen mostrar propiedades medicinales, antioxidantes muy particulares para curar la disfunción de órganos o trastornos sistémicos (Pérez Lainez, 2014).

1.1.5. Usos y aplicaciones.

Actualmente, cada vez son más los consumidores que buscan o prefieren adquirir productos naturales, orgánicos o mínimamente procesados, sin que se comprometa la inocuidad de los alimentos o productos. Es por ello que el reto de las industrias consiste en reducir los aditivos

químicos convencionales en la formulación y producción de los mismos. Con esto en mente, se ha redirigido la atención hacia los productos naturales que las plantas y especies pueden proveer, debido a que muchos de estos productos han demostrado tener propiedades adicionales, no solo el aportar sabor y olor, sino también cualidades medicinales (Aguilar & López, 2013).

Los aceites esenciales tienen numerosas aplicaciones en diferentes áreas industrias y científicas, tales como:

- **Industria Alimentaria:** Se emplean para condimentar carnes preparadas, embutidos, sopas, helados, queso, etc. También son utilizados en la preparación de bebidas alcohólicas y no alcohólicas, especialmente refrescos y en la producción de caramelos, chocolates y otras golosinas.
- **Industria Farmacéutica:** algunos aceites esenciales se utilizan en farmacia para la obtención de diversos principios activos (anetol, eugenol) o como excipientes y aromatizantes en la preparación de jarabes, suspensiones, elixires y otras formas farmacéuticas.
- **Industria Cosmética:** los aceites esenciales son utilizados ampliamente, en perfumería es muy importante debido a las cualidades olfativas de los aceites esenciales. Lo que implica que sean incorporados en un sinnúmero de composiciones: desde perfumes para aguas de colonia hasta fragancias para detergentes de ropa. En cuanto a su empleo en cosmética algunas esencias presentan funciones específicas sobre la piel, además del uso como aromatizante en diferentes preparaciones cosméticas.
- **Aromaterapia:** es una disciplina dentro de la medicina natural que emplea básicamente aceites esenciales en sus tratamientos. (López Luenco, 2004)

1.2. Cromatografía de gases.

Usualmente, los métodos para el análisis químico son en el mejor de los casos selectivos. Como resultado, la separación del analito de las posibles interferencias es a menudo una etapa de vital importancia en los procedimientos analíticos. Si a mediados del siglo XX, las separaciones analíticas se llevaban a cabo mediante procedimientos clásicos como

precipitación, destilación y extracción, hoy día, sin embargo, las separaciones analíticas se realizan en la mayoría de los casos por cromatografía. La cromatografía es un método de separación que ha sido de gran utilidad en todas las ramas de la ciencia y es frecuentemente empleado en la industria como testigo de procesos industriales. Por ejemplo, industrias químicas, petroquímicas y farmacéuticas emplean la cromatografía como técnica de determinación y control de compuestos orgánicos originados en su proceso. Por otra parte, esta técnica es también utilizada como medida de control medioambiental: contaminantes aromáticos en aire, en agua, detección y medida de pesticidas, etc. (Yagües Gomis, 2008).

La cromatografía es una técnica física de separación para la caracterización de mezclas complejas, la cual tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia y la física. Es un conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes (Parrales, Reyes, & Pine, 2012).

En cromatografía de gases, la muestra es inyectada en la fase móvil, la cual es un gas inerte (generalmente He). En esta fase, los diferentes componentes de la muestra pasan a través de la fase estacionaria que se encuentra fijada en una columna. Actualmente, las más utilizadas son las columnas capilares. La columna se encuentra dentro de un horno con programación de temperatura. La velocidad de migración de cada componente (y en consecuencia su tiempo de retención en la columna) será en función de su distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria. donde cada soluto presente en la muestra tiene una diferente afinidad hacia la fase estacionaria, lo que permitirá su separación: los componentes fuertemente retenidos por esta fase se moverán lentamente en la fase móvil, mientras que los débilmente retenidos lo harán rápidamente. El factor clave en este equilibrio yace en la presión de vapor de los compuestos (en general, a mayor presión de vapor, menor tiempo de retención en la columna). Como resultado de esta diferencia de movilidad, los diversos componentes de la muestra se separan en bandas que pueden analizarse tanto cualitativa como cuantitativamente mediante el empleo de los detectores seleccionados (Gutierrez & Droguet, 2002).

El sistema cromatográfico de gases consta de un conjunto de aditamentos que sirven para realizar una separación completa de los componentes presentes en una muestra y para su debido registro. En la Figura 2. se expone las partes básicas de un cromatógrafo (Cabrera Arriaca, 2014).

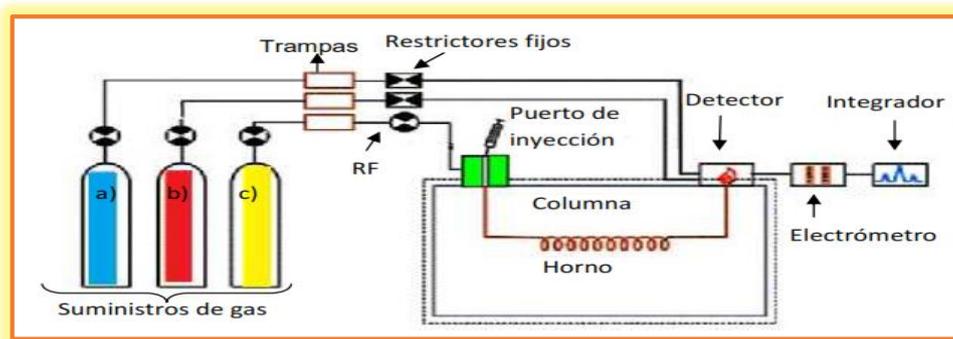


Figura 2: Sistema de cromatografía de gases: a) aire, b) nitrógeno, c) helio, RF; regulador de flujo.
Fuente: (Cabrera Arriaca, 2014).

Uno de los detectores más utilizados en cromatografía de gases (ver Figura 3) es el detector FID (ionización de llama) que es básicamente un quemador de hidrogeno/oxígeno en donde se mezcla el eluente de la columna (gas portador y analito) con hidrogeno produciendo una llama de alta temperatura que piroliza a los compuestos orgánicos lo que produce iones y electrones, que son conductores eléctricos, que van desde la punta del quemador (ánodo) a un conductor catódico. Esta corriente eléctrica es la señal que da el detector (Burneo Vivar, 2012).

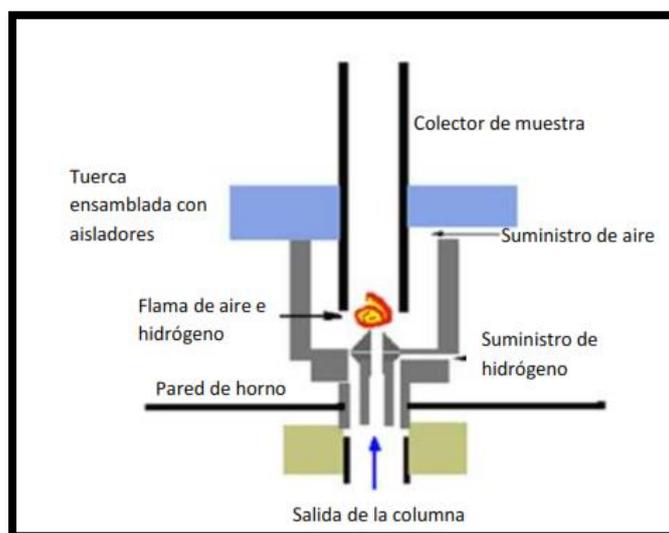


Figura 3: Detector de ionización de llama.
Fuente: (Cabrera Arriaca, 2014).

1.3. Actividad biológica.

Los aceites esenciales son el producto final del metabolismo secundario de las plantas aromáticas. Están constituidos por terpenos con actividad y composición variada. Numerosas investigaciones que se han realizado están encaminadas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas a partir de fuentes naturales, de esta manera se busca evaluar y establecer su actividad antibacteriana, antimicótica, antiparasitaria, antiviral e insecticida, por medio de extractos y aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas (Zaraza Moncayo, 2012).

Es así que actividad antimicrobiana presentada por los aceites esenciales es debida, en gran medida a la presencia de los ya mencionados “terpenoides” siendo estos los principales contribuyentes de la actividad biológica de los aceites esenciales, siguiendo en orden de actividad los terpenoides que contienen grupos alcoholes, luego los que poseen aldehídos y por último los que tienen grupos cetónicos (Maguna, Romero, Garro, & Okulik, 2006).

Es por ello que en la presente investigación se pretende llevar a cabo la evaluación de organismos patógenos causantes de múltiples enfermedades infecciosas, dentro de estas se encuentran las bacterias Gram positivas como: *Staphylococcus aureus* y bacterias Gram negativas: *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgares*, *Escherichia coli*, *Salmonella tiphymurium* y *Salmonella enterica*.

1.3.1. Bacterias.

En las últimas décadas se han hecho importantes avances en el estudio de la ultraestructura bacteriana, lográndose una identificación bioquímica de muchas fracciones subcelulares; estos avances han permitido ubicar a las bacterias en el reino Procaryotae. La comprensión de las diferentes estructuras y composición ha permitido entender como muchas bacterias se relacionan con el hombre, ya sea como integrantes de la flora normal o como agresoras para el mismo. Es así que las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria. La mayoría son de vida libre, a excepción de algunas que son de vida intracelular obligada, además poseen los mecanismos necesarios para producir energía y material genético necesarios para su desarrollo y crecimiento (Pérez & Mota, 2010).

1.3.1.1. Bacterias Gran Positivas.

Las bacterias Gram positivas está generalmente cubierta de proteínas. Los diferentes grupos de bacterias Gram positivas y las diferentes especies difieren en la composición de sus proteínas y de ácidos teicoicos; ésto es útil para la clasificación serológica y la identificación bacteriana. La pared celular de estas bacterias está constituida principalmente por una capa de peptidoglicano, se cree que ésta gruesa capa es la determinante para que estas bacterias retengan el cristal violeta de la coloración de Gram (Pérez & Mota, 2010).

- ***Staphylococcus aureus*:**

Staphylococcus es un género de bacterias anaerobias Gram-positivas productoras de enterotoxinas termoestables, distribuidas en el medio ambiente y presentes en las mucosas de los animales y personas, transmitiéndose al ser humano a través de alimentos contaminados, produciéndole una toxiinfección alimentaria. La especie más importante de este género es el *Staphylococcus aureus* (ver Figura 4), esta bacteria es muy resistente en el medio ambiente y ampliamente distribuida en la naturaleza que puede encontrarse en el aire, agua, residuos, maquinaria y superficies de la industria alimentaria, pero su principal reservorio son los animales y humanos, encontrándose en la piel, cabello, fosas nasales y garganta, y son muy persistentes en alimentos con alto contenido en sales y azúcares (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2013).

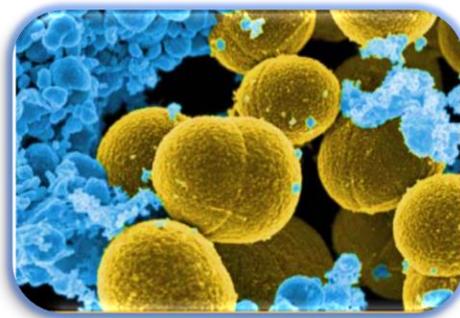


Figura 4: *Staphylococcus Aureus*

Fuente: (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2013).

1.3.1.2. Bacterias Gram Negativas.

Las bacterias Gram negativas son microorganismos que poseen una reacción con la tinción Gram en su pared celular diferente a las Gram positivas, ya que no retienen el colorante de cristal violeta durante el proceso de coloración, debiéndose a la presencia de una capa muy delgada de peptidoglucano en su pared celular y su capa más externa está cubierta por una

membrana de lipoproteínas, es así que se tiñe de color rosa (Mollinedo Patzi & Gonzáles Villalobos, 2014).

- ***Escherichia coli*:**

Escherichia coli es un tipo de bacilo gram-negativo anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae (ver Figura 5), encontrada normalmente en el tracto gastrointestinal de los seres humanos y animales de sangre caliente. Debido a su elevada presencia en el tracto gastrointestinal y en las heces, la *E. coli* se utiliza como el indicador principal de contaminación fecal en la evaluación de la inocuidad de los alimentos y el agua. La mayoría de las *E. coli* son organismos comensales inofensivos cuando se encuentran en su hábitat intestinal natural. Esta bacteria tiene la capacidad de intercambiar material genético por medio de elementos genéticos móviles, tales como plásmidos y bacteriófagos, como respuesta de adaptación a entornos nuevos y adversos (FAO, 2011).



Figura 5: Escherichia coli.
Fuente: (FAO, 2011).

- ***Proteus vulgaris*:**

Es una bacteria Gram negativa, facultativamente anaeróbica, tiene forma de bacilo y habita en el tracto intestinal tanto del hombre como de los animales. También es conocido como un agente etiológico de enfermedades tales como infección urinaria, infección quirúrgica, neumonías, bacteriemias, septicemias e infecciones ópticas. Otra característica importante del *P. vulgaris* es que presenta resistencia a la ciprofloxacina y cefalotina (Castro, 2006).

- ***Pseudomonas aeruginosa (PAE)*:**

La PAE es la especie más patógena de la familia Pseudomonadaceae, es un Gram-negativo con forma de bastoncitos finos con una longitud aproximada de 1 a 3 μm de largo y 0,5 a 1,0 μm de ancho. Causante frecuentemente de enfermedades severas en pacientes críticos, tanto

en inmunocomprometidos (cáncer, neutropénicos, enfermedades inmunológicas, etc.) como en inmunocompetentes. La PAE es inherentemente resistente a la mayoría de las penicilinas y cefalosporinas, son sensibles a los aminoglucósidos y penicilinas (LLoria, 2009).

- ***Klebsiella pneumoniae*:**

La *Klebsiella pneumoniae* es un bacilo gram-negativo, no móvil, de la familia Enterobacteriaceae. Es la especie de mayor importancia clínica y más estudiada dentro del género *Klebsiella*. Por lo que se considera como un patógeno oportunista que puede causar enfermedades tales como sepsis, neumonía e infecciones del tracto urinario y de los tejidos blandos. La mayoría de las infecciones causadas por esta bacteria se presentan en personas que han estado en contacto con entidades asociadas al cuidado de pacientes, entre las cuales, los hospitalizados, inmunosuprimidos o con enfermedades de base son los más afectados.

- ***Salmonella typhimurium*:**

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos gramnegativos, no formadores de esporas, anaerobios facultativos, que puede en ocasiones sobrevivir en bajas condiciones de oxígeno. Estos bacilos no producen esporas y la mayoría de las cepas son móviles debido a que poseen flagelos peritricos, que rodean a la célula. La *S. typhi* produce ácido a partir de glucosa, maltosa y sorbitol, sin la producción de gas; pero no fermenta la lactosa, sacarosa, la ramnosa y otros azúcares. Produce nitrito a partir de nitrato y también produce ácido sulfhídrico. Esta bacteria es causante de la fiebre tifoidea solo en humanos (Jurado Jiménez, Arenas Muñoz, Doblas Delgado, Rivero, & Torre-Cisneros, 2010).

- ***Salmonella entérica*.**

En el género *Salmonella* se incluye actualmente dos tipos de especies *S. entérica* y *S. bongori*. La *S. entérica* es aislada de humanos y de animales de sangre caliente e incluye la mayoría de los aislamientos patógenos de humanos. Son bacilos Gram negativos aero-anaerobios facultativos con un contenido en guanina-citosina, no producen endoesporas y por lo general son móviles por flagelación peritrica (ver Figura 6). Este tipo de bacteria es la causante de enteritis o enterocolitis, ya que generalmente penetra en el hospedador vía digestiva, a través de alimentos o agua contaminada (Martínez Álvares, 2007) .

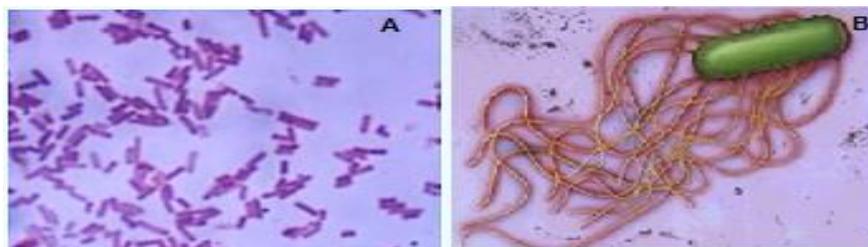


Figura 6: Salmonella entérica. **(A)** Tinción Gram; **(B)** Flagelación peritrica
Fuente: (Martínez Álvarez, 2007).

1.4. Actividad antioxidante.

Los antioxidantes naturales presentes en las plantas han cobrado gran interés en las últimas dos décadas puesto que el estrés oxidativo (un desbalance entre las sustancias oxidantes y prooxidantes) está implicado en un gran número de afecciones de la salud. Se ha demostrado que el daño oxidativo causado por los radicales libres está relacionado con una amplia gama de enfermedades y desordenes incluyendo: fallo cardíaco, inflamaciones, cataratas, daños cerebrales, entre otros. Por lo tanto, el suministro de antioxidantes exógenos podría tener efectos benéficos y ser una alternativa en la prevención de dichas enfermedades (Calderón Hernández, 2011).

Un antioxidante es una molécula que ayuda a retrasar o prevenir la oxidación de otras moléculas. El sistema de defensa antioxidante está constituido por compuestos de naturaleza enzimática como: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, y compuestos de naturaleza no enzimática como: vitamina E, beta-caroteno, vitamina C, glutatión reducido, albúmina, flavonoides y metales de transición como Se, Cu, Zn, entre otros (Ramos Llica, Castañeda Castañeda, & Ibañez Vásquez, 2008).

Es por ello que actualmente existen varios métodos para determinar la actividad antioxidante, los cuales se basan en su capacidad para captar radicales libres. Entre ellos se pueden mencionar el uso del 2,2-difenil-1-picril hidrilo (DPPH), ácido 2,2', azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6- sulfónico (ABTS), la reacción con el óxido nitroso (test NO), dicloridrato de N, N-Dimetil-p-fenilendiamina (DMPD), generación de radicales peróxido, superóxido e hidroxilo, y otros (Ramos Llica et al., 2008).

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

Este método fue reportado inicialmente por Miller y colaboradores, y se basa en la capacidad que tiene un antioxidante para estabilizar el radical catión coloreado ABTS•+, el cual es formado previamente por la oxidación del ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfónico)) por metamioglobina y peróxido de hidrógeno. Los resultados son expresados como equivalentes de Trolox o TEAC (por su nombre en inglés, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) que es una técnica usada para medir la capacidad antioxidante de un material biológico, así como de compuestos puros o extractos de plantas. Entre las ventajas de este método está que los valores de TEAC de una amplia gama de alimentos están reportados lo que permite establecer comparaciones; adicionalmente puede ser usado en un amplio rango de pH y fuerza iónica, además que el ABTS•+ es soluble tanto en medio acuoso como orgánico y permite la evaluación de antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos (Londoño Londoño, 2012).

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

Este ensayo fue propuesto originalmente por Brand-Williams. El DPPH• es uno de los pocos radicales orgánicos estables, presenta una fuerte coloración violeta decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante, es comercialmente disponible y no tiene que ser generado in situ como el ABTS•+. Este ensayo se fundamenta en la medición de la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical DPPH•, esta medición puede hacerse espectrofotométricamente siguiendo el decaimiento de la absorbancia a 517 nm. La reacción de estabilización se considera que transcurre principalmente mediante un mecanismo TE (Métodos basados en la transferencia de electrones), con un aporte marginal de TAH (Métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno). El DPPH• es un radical estable, centrado en nitrógeno, existen muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peroxilo no lo hacen así con DPPH•, debido al impedimento estérico que representa la estructura química que rodea al radical, lo cual hace que sustancias pequeñas generalmente muestren una mayor actividad (Londoño Londoño, 2012).

1.5. Plantas medicinales.

El uso de plantas medicinales es resultado de la experiencia e íntimo contacto con la naturaleza que el hombre ha acumulado por generaciones, así como de la convivencia entre las culturas de diferentes pueblos. Este saber ha permitido la subsistencia de comunidades que habitan en lugares apartados, donde las parteras, “yerberos” y curanderos son los principales responsables de la salud de los habitantes (Gómez Álvarez, 2012).

Las plantas medicinales son aquellas que obtienen uno o más principios activos que son los que contienen la actividad medicinal. Numerosos compuestos o grupos, pueden provocar variaciones no tóxicas en el organismo, su toxicidad depende de la parte empleada y dosis consumida. El efecto tóxico puede ser inmediato o a largo plazo (Rodríguez Flores, Torrez Centeno, & Valenzuela Betanco, 2005).

Las sustancias activas que poseen dichas plantas en alguna parte de su anatomía (flores, hojas, raíces y semillas), determinan su efecto terapéutico sobre el organismo animal o humano. El espectro de acción de cada planta es amplio, lo que le permite cumplir con varias funciones. Aunque, si la preparación y dosificación de la receta de la planta son inadecuadas, entonces por sus propiedades (naturaleza físico-química y por incompatibilidad vital), altera el conjunto de funciones de un organismo conduciéndose a diversas reacciones o algún trastorno fisiológico (Rodríguez Flores et al., 2005).

El manejo de las plantas medicinales como recurso terapéutico es bastante difundida en todo el mundo, el 67 % de las especies vegetales medicinales son originarias de países en vías de desarrollo. Son consideradas como terapia complementaria o alternativa en salud y su uso ha sido creciente. El empleo de las plantas generalmente está fundamentado en el conocimiento popular, y muchas veces, los pacientes no relatan su utilización a los profesionales de salud (da Silva Lima, Oliveira de Arruda, Rogério, & Martins Alvarenga, 2012). Sin embargo, diferentes investigaciones reportan que las plantas medicinales utilizadas en etnomedicina ancestral tiene mayor probabilidad de presentar actividad farmacológica que aquellas seleccionada al azar o por criterios quimiotaxonómicos (Armijos, 2015).

1.6. Flora ecuatoriana.

Ecuador, con una área de 283.791 Km², se encuentra en plena zona tropical. El país entero está atravesando longitudinalmente por la Cordillera de los Andes, la cual define a lo largo del mismo, una orografía y topografía muy marcada y diferente, lo que hace posible que sea considerado como un país megadiverso, ya que presenta la más alta densidad de biodiversidad, con el 10% de las plantas y los animales del mundo presentes en 256.370 Km²; superficie equivalente al tamaño del estado de Colorado en Estados Unidos o un tercio de Francia (Guzmán Armas, 2011).

Se ha podido identificar alrededor de 46 ecosistemas que entre los más importantes están: los bosques occidentales, manglares, bosques andinos, la Amazonia y Galápagos. Por su

gran diversidad 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 16 000 especies de plantas. Este número en los últimos años se ha incrementado en un 6 %, por lo que en la actualidad el número de especies vasculares sobrepasa las 17 000 (Balslev, Navarrete, Torre, & Macía, 2008).

1.6.1. Flora aromática del Ecuador.

Ecuador es una zona rica en recursos naturales y de abundante producción de plantas aromáticas, lo que da la oportunidad de crear variedad de productos a base de plantas aromáticas, aprovechar los recursos naturales e impulsar la agroindustria. El cultivo de plantas aromáticas puede desarrollarse porque existen tierras aptas para su producción; su comercialización está asegurada puesto que el mercado es amplio y para ello hay que convertirlos en rentables. Actualmente, las hierbas aromáticas, su uso y la exportación es un tema de importante en el Ecuador, hay muchas razones para este auge como, por ejemplo, los actuales sistemas de atención de salud, incluida la medicina moderna y sus terapias que se basan en el uso de los medicamentos preparados con plantas aromáticas o componentes de dichas plantas, ya que gran parte de la población mundial depende de la medicina tradicional para cubrir sus necesidades diarias de salud, especialmente en los países en desarrollo (Vargas Corrales, 2010).

1.7. La familia Annonaceae.

La familia Annonaceae comprende 120 géneros y aproximadamente 2500 especies, por lo que es de entre las Magnoliidae la más diversa en géneros y la tercera más rica en especies. Se distribuye en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, en donde sus representantes son parte importante de la composición florística de muchos bosques tropicales de tierras bajas. Algunas especies de frutos comestibles como la guanábana (*Annona muricata*), chirimoya (*Annona cherimola*) y chincuya (*A. purpurea*) pertenecen a esta familia. Frecuentemente se utilizan las hojas, tallos y raíces de especies de distintos géneros en la medicina local o han servido para aislar diversos compuestos químicos útiles en la farmacología (Ortiz Rodríguez, Sosa, & Ruiz Sanchez, 2015).

Esta familia abarca a un grupo de plantas que producen frutos de sabor exquisito, además, de su importancia económica en algunas regiones del mundo. Está compuesta principalmente

por plantas tropicales, siendo muchas de ellas nativas de Ecuador, Perú y Brasil. Las especies, según sus características, se agrupan en comestibles establecidas en plantaciones comerciales, las de uso medicinal, industrial y las empleadas como plantas exóticas y en labores de reforestación. La similitud en las especies de este género causa a menudo confusión en la identificación popular, principalmente debido a las denominaciones regionales.

El gran número de especies, taxas en la familia *Annonaceae* y sus consecuentes dificultades para la clasificación, no permiten detallar la variedad en cuanto a flores, frutos y morfología del polen, hábitat, preferencias de hábitat y aspectos de la polinización. Esta variabilidad contribuye a explicar su aparente capacidad para ocupar un amplio rango de nichos ecológicos. Ciertos estudios en el Amazonas han permitido afirmar que la familia *Annonaceae* está entre las cinco familias de plantas más importantes en términos de diversidad y abundancia de especies (Vega, 2013).

1.7.1. El género *Annona*.

El nombre en latín 'annona' significa (producto anual o cosecha anual), indicando así su típico ciclo anual de producción. El rasgo característico del género *Annona* es su fruto que es un sincarpio, formado por la amalgamación de muchos pistilos y el receptáculo carnoso. Este género también presenta una gran diversidad genética, reflejando los diferentes centros de origen de muchas de las especies. Se cree que la mayoría de ellos se originaron en las tierras bajas calientes y húmedas de América Central y el norte de América del Sur. Una excepción a esto es la chirimoya (*Annona cherimola*) que se originó en las tierras altas andinas subtropicales. El número de cromosomas para la mayoría de las especies *Annona* es $2n = 2x = 14$ o 16 , con la excepción de *A. glabra* que es tetraploide. Muchas de las especies son aparentemente sexualmente compatibles. La atemoya es un híbrido natural entre *Annona cherimola* y *Annona squamosa* (Scheldeman, 2002).

El género presenta unificadas características, especialmente con relación a la altura de la planta, sistema radical, corteza, tallo, biología floral, polinización, conjunto de frutos y tipo de fruto. Existen importantes variaciones entre las plantas de semilla de *Annona* dentro de las mismas especies, afectando no sólo la madurez y la productividad de follaje de las plantas, sino también el tamaño del fruto, forma, color, calidad y número de semillas en el fruto. Estas variaciones, que son a menudo bastante pronunciadas, han dado lugar a varios nombres de la misma especie. En general las anonas son arbustos o pequeños árboles, cuya altura oscila entre los 5 m y 11 m, dependiendo de varios factores, tales como: el clima, el suelo y los

cultivos. Son erectos y algo extendidos en su hábito de crecimiento, su corteza es gris oscura a menudo áspera y corrugada. Por lo general, los tallos de *annona* son grisáceos, y tomentosos cuando son jóvenes, pero más tarde son glabros. Con pocas excepciones, son caducifolios, incluso en las especies tropicales, especialmente cuando se cultiva en zonas con estaciones secas o frescas y sin riego (Agustín & Ledesma, 2014).

Es por ello que muchas de las especies *Annona* producen frutas comestibles con un sabor muy apetecible, pero debido a la vulnerabilidad de la piel de los frutos y la corta vida útil, las especies de *Annona* no ocupan aún un nicho importante en el creciente mercado comercial de frutas tropicales.

1.7.1.1. *Annona cherimola*.

La chirimoya perteneciente a la familia Annonaceae, es una planta nativa de la región altoandina de Ecuador y Perú con gran diversidad en la provincia de Loja, en la que podemos encontrar un gran número de poblaciones o ecotipos, con una gran diversidad genética, además se encuentra integrando densos bosques silvestres y en algunos huertos agrícolas (Rodríguez Albornoz, 2013).

El nombre chirimoya deriva de ‘chirimuya’ que en Quechua significa “semilla fría”. Esto hace referencia a la región andina donde está presente esta especie, que es relativamente fría comparada con las regiones donde están presentes el resto de las especies de *Annona*. El fruto de la *Annona cherimoya* es considerado entre los más sabrosos, consumiéndose principalmente como fruta fresca, también es una buena fuente de vitaminas B1, B2, B3, hierro, calcio y fósforo. El calentamiento de la pulpa produce oxidación enzimática, lo que afecta tanto a su color como a su delicado aroma (Vanhove, 2008).

Hay alrededor de 50 especies de chirimoyas, de las cuales únicamente unas ocho son de interés comercial internacional, el resto sólo abastece mercados locales. Por lo general, se identifican por su color, tamaño y sabor. Las más usuales son: **verdes** (grandes y pequeñas), **grises** (de aspecto oxidado), y **rojas o rosas** (las de mayor tamaño). También pueden fermentarse para la obtención de bebidas alcohólicas. En las hojas, tallos, corteza y semillas se han detectado compuestos citotóxicos y alcaloides con uso farmacéutico y antimicrobial además de sus propiedades insecticidas (Vildózola, 2002). En la Tabla 1. Es mostrada la taxonomía de la especie *Annona cherimola* (Figura 7).

Tabla 1: Características taxonómicas de *Annona cherimola*.

Nombre Científico	<i>Annona cherimola</i>
Reino:	Vegeta
Subreino:	Embriophyta
División:	Spermatophyta
Subdivisión:	Angiospermae
Clase:	Dicotyledoneae
Orden:	<i>Ranales</i>
Suborden:	Magnoliales
Familia:	<i>Annonaceae</i>
Subfamilia:	Annonoideae
Género:	<i>Annona</i>
Especie:	<i>Annona cherimola</i> Miller

Autor: (Vega, 2013)



Figura 7: Especie *Annona cherimola*.

Fuente: La Autora

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Metodología

La metodología que se llevó a cabo en esta investigación fue desarrollada bajo el siguiente esquema:

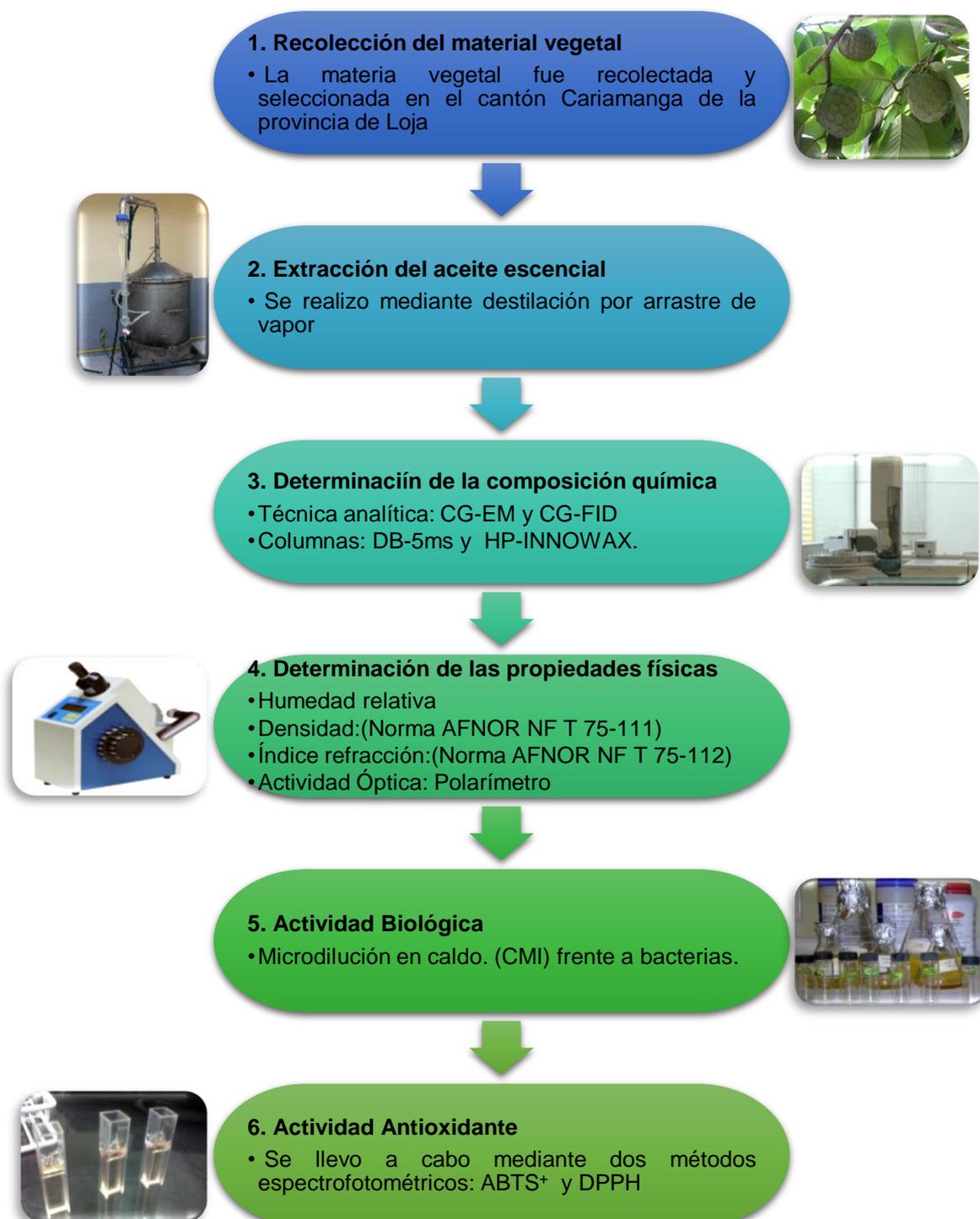


Figura 8: Esquema del desarrollo de la investigación.
Fuente: La Autora

2.1.1. Recolección de la materia vegetal.

Las hojas de la especie *Annona cherimola* (ver Figura 10) fueron recolectadas en el barrio Cango Bajo del cantón Cariamanga de la provincia de Loja, en la Figura 9 se observa la ubicación geográfica de dicha especie con las siguientes coordenadas: latitud 4°20´S, longitud 79°34´W y una altura 1950 m s. n. m., realizando tres recolecciones distintas con intervalos de 15 días, iniciando el 16 de octubre del 2015, la segunda recolección se realizó el 07 de diciembre del 2015 y la última recolección se realizó el 4 de enero del 2016.

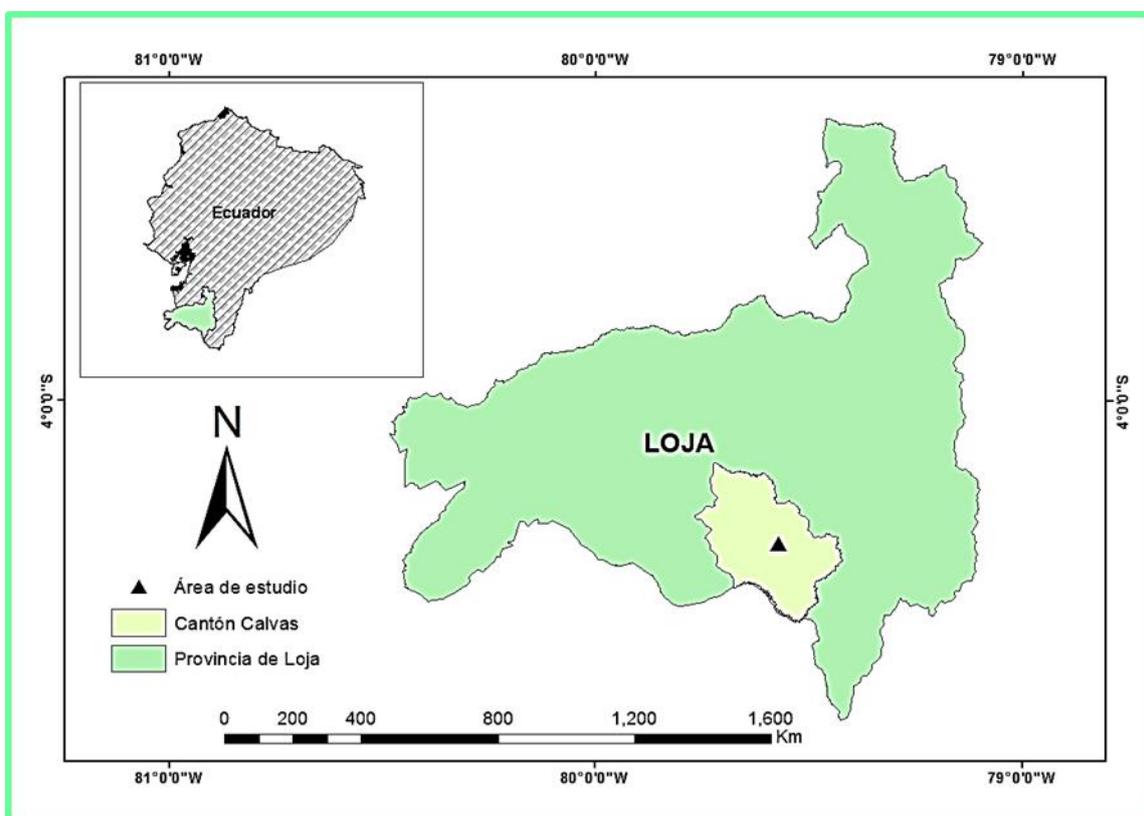


Figura 9: Área de recolección de la especie *Annona cherimola*
Elaboración: Manejo y Gestión de Recursos Naturales UTPL (Benitez, 2017).

Una vez hecha la recolección la muestra vegetal fue llevada hasta los laboratorios del Departamento de Química y Ciencias Exactas de la UTPL para su debido tratamiento post cosecha, el cual consistió en la selección del material vegetal, eliminando las partes deterioradas de las hojas, así como polvo y tierra con el fin de evitar posibles contaminantes y que estos puedan interferir 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 vegetal.



Figura 10: Muestra recolectada (hojas de *A. cherimola*).
Fuente: La Autora

2.1.2. Extracción del aceite esencial.

Se realizaron tres destilaciones distintas cada una por triplicado, dándonos así un total nueve destilaciones. El aceite esencial se obtuvo a partir de las partes aéreas de la especie en este caso de las hojas. La extracción fue realizada en un equipo de destilación por arrastre a vapor (ver Figura 11), el cual contiene en su interior una placa perforada donde es colocado el material vegetal y por debajo de esta placa se deposita agua, una vez que llegue al punto de ebullición, el vapor resultante de este proceso circula a través del material vegetal separando las sustancias orgánicas insolubles en agua y ligeramente volátiles, de otras no volátiles que se encuentran en la mezcla, una vez que este vapor atraviesa el condensador la mezcla de aceite y agua es recolectada en un florentino donde se separa por diferencias de densidades.

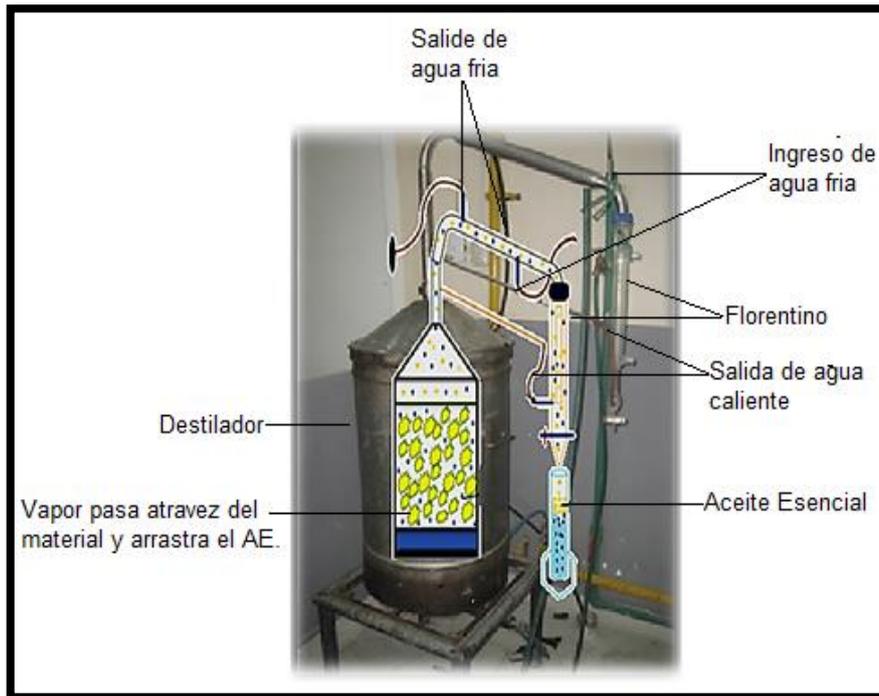


Figura 11: Equipo de extracción del aceite esencial.
Fuente: La Autora

Finalizada la destilación se procedió a recoger el aceite esencial en una probeta y así medir su volumen (figura 12), para luego ser almacenados en frascos ámbar herméticamente cerrados y debidamente etiquetados, con su respectivo código, para cada muestra de aceite se hizo constar la inicial de la especie vegetal, el número de recolección, número de destilación y fecha de destilación como se muestra en la Figura 13. Después estos aceites serán puestos en refrigeración a -4°C .



Figura 12: Recolección del aceite esencial
Fuente: La Autora.



Figura 13: Recolección del aceite esencial
Fuente: La Autora

2.1.3. Determinación de las propiedades físicas.

Las propiedades físicas determinadas fueron: la humedad relativa, la densidad relativa según la norma AFNOR NFT75-111, el índice de refracción según la norma AFNOR NF 75-112 25 y la actividad óptica del aceite esencial de las hojas de *Annona cherimola* (chirimoya).

2.1.3.1. Determinación de la humedad relativa de la planta.

Para determinar la humedad se emplearon las hojas de *Annona cherimola* en estado fresco, de las cuales se tomó aproximadamente de 1 g, previamente cortadas en pequeños pedazos obteniendo así una muestra homogénea. Esta muestra fue colocada en cápsulas de porcelana las cuales fueron llevadas a una lámpara ULTRA X por 45 minutos y posteriormente fueron colocadas en el desecador por 5 minutos, una vez retirado el material vegetal del desecador fue nuevamente expuesto a la lámpara por 15 minutos con el fin de eliminar el agua presente en la especie, este proceso se realizó de 4 a 5 veces hasta que el peso se mantuviese constante (Correa Conza, 2014), ver Figura 14.



Figura 14: Equipos para la determinación de la humedad del aceite esencial.
Fuente: La Autora

Cabe mencionar que esta determinación de humedad se realizó por triplicado, por cada una de las recolecciones con el fin de alcanzar resultados confiables. Una vez finalizado el procedimiento se procedió a realizar los respectivos cálculos para determinar la humedad de dicha especie (Ver Anexo I).

2.1.3.2. Determinación del rendimiento del aceite esencial.

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

2.1.3.3. Densidad relativa del aceite esencial.

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

Para determinar la densidad relativa del aceite esencial *Annona cherimola*, se unió las tres muestras de aceites obtenidas por cada destilación, para los valores obtenidos se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación, obteniendo así una densidad promedio de cada una de las muestras.

2.1.3.4. Índice de refracción del aceite esencial.

El índice de refracción se determinó según la norma AFNOR NF 75-112 25 (ISO 280:1998) (Ver Anexo IV), para lo cual se utilizó un refractómetro ABBE, con la ayuda de una micropipeta se tomó una gota de aceite esencial de cada una de las muestras y se colocó sobre el diafragma del refractómetro, posteriormente se calibro el refractómetro y se verifico el índice de refracción dado para cada muestra.

2.1.3.5. Actividad óptica del aceite esencial.

Para medir la actividad óptica se empleó un polarímetro digital modelo Mrc- Automatic Polarimeter P810 (ver Figura 15) y una celda de 1 dm de longitud, en el que se midió la capacidad para desviar la luz polarizada del aceite esencial de la muestra.

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



Figura 15: Polarímetro digital

Fuente: La Autora

2.1.4. Determinación de la composición química del aceite esencial.

En la identificación de los componentes presentes en el aceite esencial se empleó un cromatógrafo de gases de alta resolución.

2.1.4.1. Cromatografía de gases.

Para determinación de la composición química del aceite esencial de las hojas de *A. cherimola* se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas y al detector de ionización de llama FID, las corridas cromatográficas se hicieron en dos columnas, una polar HP-Innowax y una no polar DB-5ms, con el propósito de llevar a cabo el análisis cualitativo y cuantitativo respectivamente.

2.1.4.1.1. Preparación de la muestra.

Las muestras de aceite esencial para las inyecciones cromatográficas se prepararon en un vial para cromatografía debidamente rotulado, colocando en el 990µL de diclorometano y 10µL de aceite, obteniéndose una dilución al 1% de aceite esencial, se prepararon 9 disoluciones con los 9 aceites obtenidos en cada destilación.

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

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

El equipo utilizado para hacer los respectivos análisis fue un Cromatógrafo de Gases Agilent serie 6890N, acoplada a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973 Inert; este equipo dispone de un sistema de datos "MSD-Chemstation D.01.00 SP1", que cuenta con un inyector automático Split/splitless serie 7683 y un detector de ionización de llama (FID) provisto de un generador de hidrogeno Gas Generator 9150 Packard" (Figura 16). Es así que con la ayuda de este equipo se identificó los componentes químicos del aceite esencial de las hojas de *A. cherimola* y la obtención de los espectros de cada compuesto individual. Las respectivas inyecciones se efectuaron en las columnas capilares DB-5MS y HP-INNOWAX.



Figura 16: Cromatógrafo de gases

Fuente: La Autora

El tamaño de las columnas fue de 30mx0, 25mm x 0,25 μ m. La columna no polar está recubierta internamente de 5%-Fenil-metilpolisiloxano y la columna polar tiene un recubrimiento interno de polietilenglicol. La temperatura límite para la columna DB-5MS es de 325°C y para la columna HP-INNOWAX la temperatura es de 260°C.

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

Para las respectivas corridas cromatográficas se usaron algunas medidas bajo las cuales se inyectaron las muestras del aceite esencial de *Annona cherimola*. Además, 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 17.

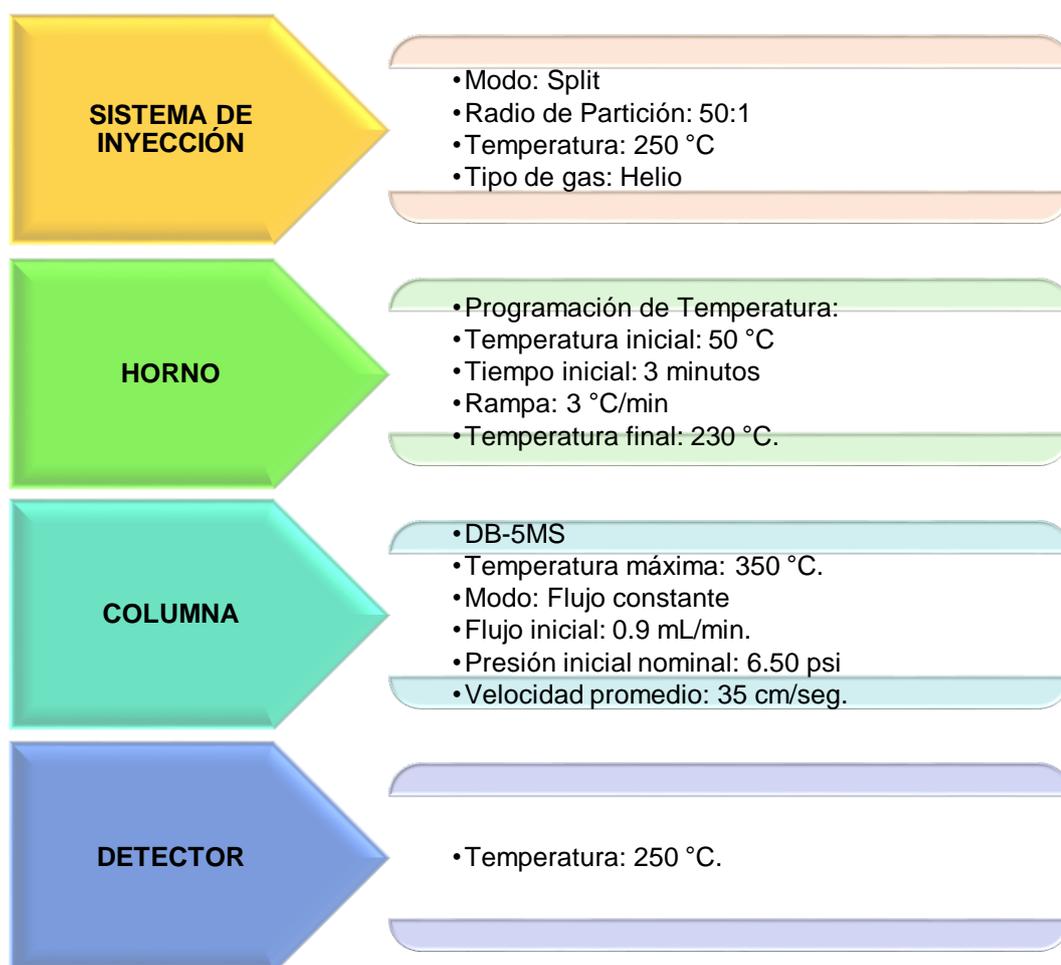


Figura 17: Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna no polar (DB-5MS)
Fuente: La Autora.

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

Las características bajo las cuales se inyectó los hidrocarburos y las muestras en el cromatógrafo se describen en la figura 18.

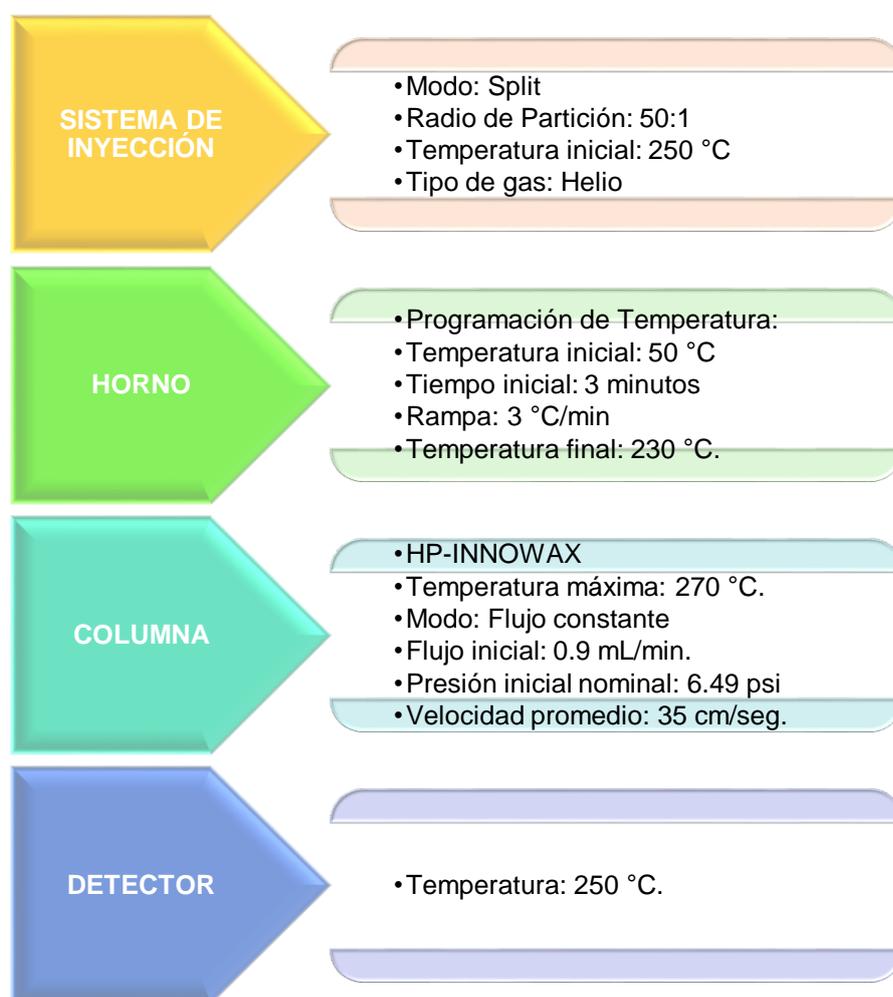


Figura 18: Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna polar (HP-INNOWAX)

Fuente: La Autora

2.1.4.1.5 Identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos químicos del aceite esencial de *Annona cherimola*, tanto en la columna polar como en la columna no polar.

Como resultado final de la corrida cromatográfica, los compuestos se observaron en un cromatograma, gráfico que representa la señal producida por el detector en función del tiempo de elución o volumen de eluyente añadido. La identificación de los componentes de la muestra se lleva a cabo a partir de la posición de los distintos picos respecto al eje del tiempo mientras que el área de cada uno, proporcional a la concentración del compuesto, permite el análisis cuantitativo.

Para que la identificación sea más precisa y confiable se procedió a integrar, mediante el sistema de integración Chemstation Integrator-autoint que es propio del equipo de cromatografía de gases, permitiéndonos así tener una determinada cantidad de compuestos en cada una de las muestras analizadas, para trabajar después con los picos integrados.

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

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

Dónde:

IK: Índice de retención de Kovats

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

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

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

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

Una vez calculado el índice de Kovats (IK) de cada compuesto que fue determinado experimentalmente en las corridas cromatográficas tanto en la columna polar como no polar, estos valores se compararon con los reportados por Adams (2009), en bases de datos electrónicas como Nist (National Institute of Standards and Technology), en revistas publicadas por Taylor and Francis (revisas en línea), de modo que la diferencia entre el IK calculado y el leído sea menor a 20 unidades. También, se tomó en cuenta parámetros como el número de CAS que presenta cada compuesto de tal modo que facilite la búsqueda y la identificación de los IK de los constituyentes químicos del aceite esencial de la *Annona cherimola*.

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

La metodología llevada a cabo con el detector de ionización de llama (FID) para el análisis de la composición química del aceite esencial de *A. cherimola* es igual a la metodología que se llevó a cabo en la cromatografía de gases acoplada al espectrómetro de masas. Lo interesante de este detector es que funciona mediante la pirolisis del material que eluye de la columna en

una llama de hidrógeno/aire con exceso de oxígeno, siendo destructivo para la muestra. En esta corrida se inyectaron hidrocarburos, previo a la inyección de las muestras de aceite esencial de las hojas de *Annona cherimola*. Lo único que cambian son las condiciones en las que opero el cromatógrafo. Estas condiciones se exponen en la figura 19.

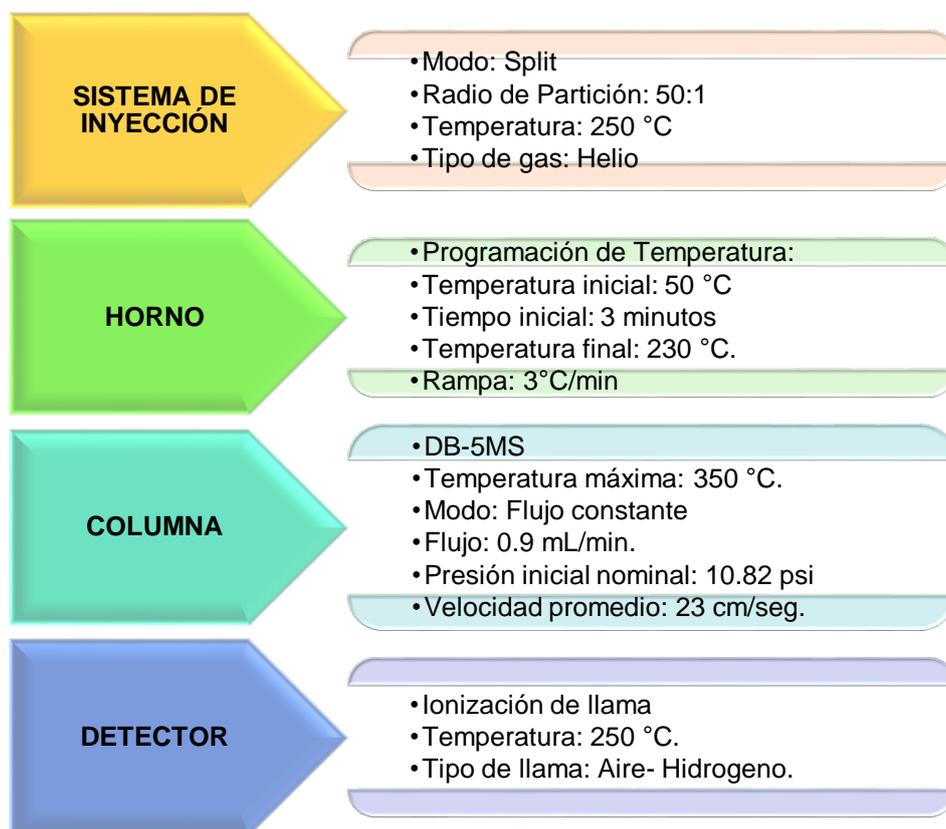


Figura 19: Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna no polar (DB-5MS) acoplada a un detector de ionización de llama (FID).

Fuente: La Autora

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

Las muestras inyectadas tuvieron el mismo proceso que en las cromatografías realizadas anteriormente junto con la inyección de hidrocarburos (C10 decano a C25-pentacosano), de la misma forma que se llevó a cabo en la columna no polar. Las condiciones tácticas utilizadas en el tratamiento de estas muestras son las siguientes (figura 20).

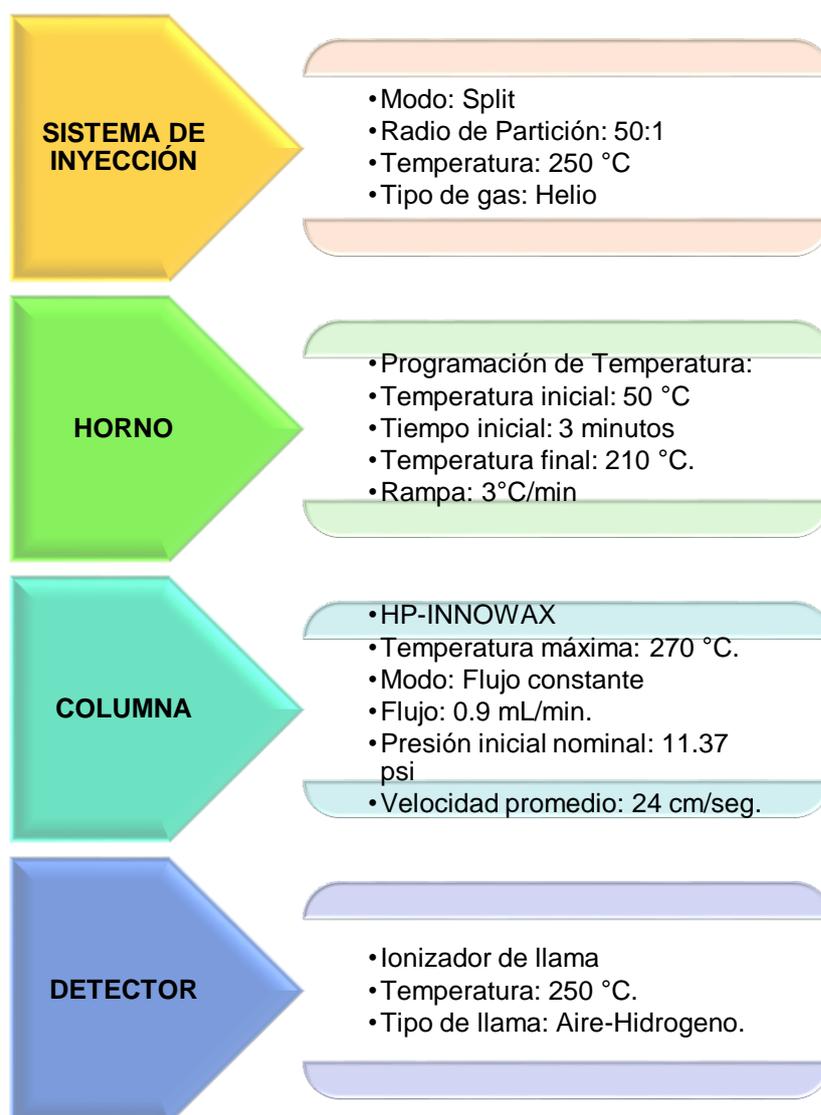


Figura 20: Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna polar HP-INNOWAX acoplada a un detector de ionización de llama (FID).
Fuente: La Autora.

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

Una vez eluidos los compuestos, se procedió a la cuantificación de los mismos. Los datos de hidrocarburos obtenidos en masas y en FID fueron utilizados para desarrollar la ecuación de la recta con la cual se calcula los tiempos de retención de cada compuesto. Estos tiempos de

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

2.1.5. Determinación de la actividad biológica del aceite esencial de *Annona cherimola*.

Para comprobar la actividad biológica del aceite esencial de *Annona cherimola* se utilizó el método de microdilución en caldo frente a diferentes cepas bacterianas. Basado en la inhibición del crecimiento bacteriano, mediante el uso de diluciones a diferentes concentraciones, determinándose así la Concentración mínima inhibitoria (CMI).

2.1.5.1 Cepas bacterianas empleados.

Para evaluar la actividad biológica se utilizaron diferentes tipos de cepas bacterianas patógenas, para determinar si el aceite de *Annona cherimola*, 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 2.

Tabla 2: Microorganismos de prueba.

MICROORGANISMOS PATOGENOS	
Cepas bacterianas	
Bacterias Gram-negativas	Bacterias Gram- positivas
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
<i>Scherichia coli</i> ATCC 25922	
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 9997	
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	
<i>Salmonella entérica</i> ATCC 29212	

Fuente: American Type Culture Collection.

2.1.5.2. Prueba utilizada para evaluar la actividad antibacteriana.

La actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Annona cherimola*, se determinó utilizando el método de microdilución en caldo reportando los resultados como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI); la cual corresponde a la concentración más baja que llegaría a tener un antimicrobiano al momento de inhibir el crecimiento de cierto tipo de microorganismo después de su incubación (Andrews, 2001).

2.1.5.2.1. Método microdilución en caldo.

El método de microdilución en caldo, posee la ventaja de que se utilicen volúmenes mínimos de la muestra a analizar. Para este proceso se hace uso de 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 empleada en este ensayo, debe estar previamente diluida en un disolvente adecuado y a una concentración determinada. Con fines de bioprospección se utiliza una solución de 100 μ L del aceite esencial en 400 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido). (ver Figura 21)



Figura 21: Dilución de aceite esencial y solvente.
Fuente: La Autora.

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 una de las cepas bacterianas. Para la siembra en el caldo de cultivo

específico, se utilizarán 30 µL de cada cepa bacteriana, que se encontraban almacenadas en una reserva criogénica a -80 °C. Posteriormente a realizar la siembra de cada cepa se incuban los medios por 14 – 16 horas a 37 °C, por esta razón el cultivo se denomina overnight. Las condiciones necesarias para el crecimiento de cada bacteria y los medios de cultivo necesarios se detallan en la tabla 3.

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

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

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.

En una cabina de seguridad, previamente esterilizada con alcohol y con filtro UV para evitar contaminaciones se procedió con el análisis del aceite. Esta prueba se realizó en microplacas

de 96 pocillos mediante dilución doble seriada de la siguiente manera: se colocaron 180 μL de caldo Mueller Hinton en cada pocillo de la primera fila, con excepción de la columna 10, y 100 μL a los pocillos restantes, después se adicionaron 20 μL de la solución de aceite diluido a cada pocillo de la primera fila excepto a los tres últimos pocillos, los cuales contendrán: **1.** como control de esterilidad (200 μL de caldo Mueller Hinton); **2.** control negativo (180 μL caldo Muller Hinton + 20 μL DMSO) y **3.** como control positivo (180 μL caldo Muller Hinton + 20 μL de Tetraciclina de 1.953 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para todas las bacterias utilizadas a excepción de *Salmonella typhimurium* para la cual se empleó Tetraciclina de 3.906 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para la *Pseudomonas aeruginosa* fue de 15.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$. y *Proteus vulgaris* que se empleó Tetraciclina de 7.813 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 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 de los cuales 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 22). El mismo procedimiento fue aplicado para el control positivo, negativo y de esterilidad.

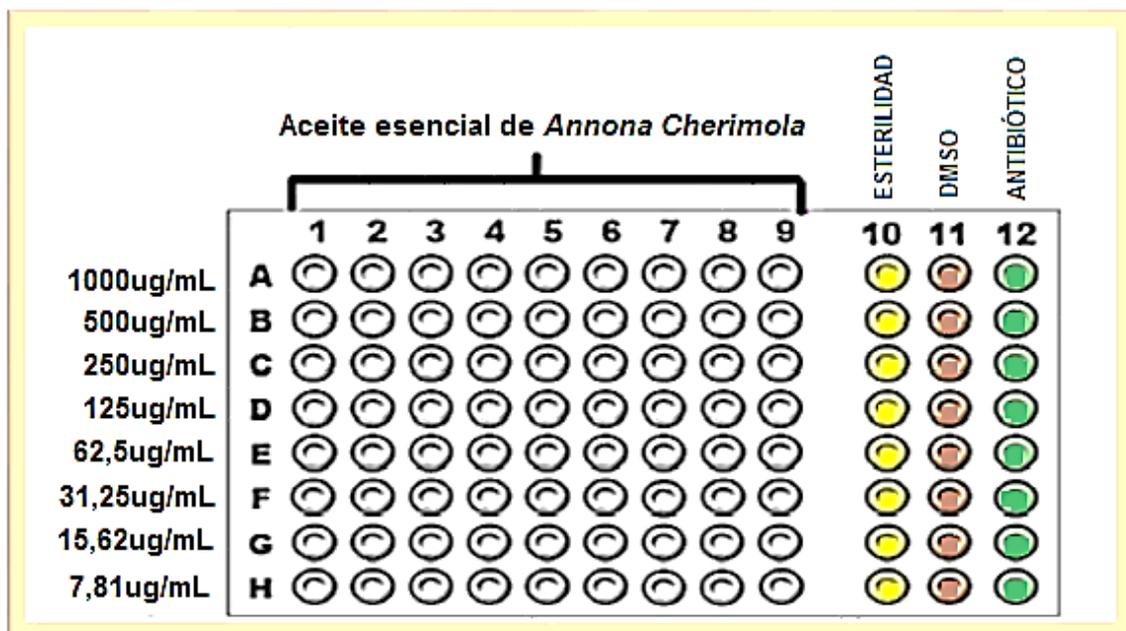


Figura 22: Modelo de Microplaca IC96 para bacterias con las concentraciones de aceite ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

Fuente: La Autora.

Una vez ya preparada la placa de microdilución se procedió a la inoculación con 100 μL de la suspensión del inóculo bacteriano en todos los pocillos, a excepción de los pocillos en los que

se coloca los controles de esterilidad, control positivo y negativo; completando así un volumen final de 200 μL , ajustando la población bacteriana a 5×10^5 ufc/mL. Al concluir la inoculación, las placas se sellaron con parafilm y fueron incubadas a 37 °C de 18 a 24 h.

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

Una vez que las placas de microdilución ha sido retiradas de la incubadora, se procedió a observar cuidadosamente cada caja utilizando luz reflejada; se inició examinando el control de esterilidad para descartar cualquier tipo de contaminación, ya que al existir contaminación la prueba no puede ser interpretada y debe ser repetida. Por otro lado, el control positivo nos indicó que existió un crecimiento adecuado de las bacterias en la placa de microdilución. El crecimiento en este pocillo se nota como turbidez o un pellet > 2 mm.

Finalmente, en el control negativo no se debe observar ningún rastro de crecimiento, al contrario, debe estar claro y sin turbidez. Para determinar así en qué punto se encuentra la concentración mínima inhibitoria de una muestra, es decir la concentración más baja a la que puede llegar a actuar el aceite como antimicrobiano, se debe leer el pocillo en el cual se distinga turbidez del medio. Siendo un proceso manual no hace falta la ayuda de ningún aparato óptico.

2.1.6. Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial del fruto de *Annona cherimola*.

Para evaluar la actividad antioxidante del aceite esencial de las hojas de *Annona cherimola*, se empleó dos métodos espectrofotométricos: ABTS+ y DPPH, para cada uno de ellos se realizaron modificaciones en el procedimiento relacionado con las concentraciones de las muestras y el empleo de un estándar de referencia (Trolox) con la finalidad de comparar la actividad antioxidante de las muestras frente a ellos.

Las mediciones fueron determinadas según las absorbancias leídas del equipo de cada muestra. Se utilizó un espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS Scanning 333907 (ver Figura 23 y 24). Las longitudes de onda empleadas en cada método fueron 734 nm y 515 nm respectivamente.



Figura 23: Espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS Scanning 333907
Fuente: La Autora



Figura 24: Diluciones para la actividad antioxidante.
Fuente: La Autora

2.1.6.1 Preparación de la muestra de aceite esencial de Annona cherimola.

Para realizar el análisis del aceite esencial mediante los métodos ya citados, se tomó una muestra de 5 mg de aceite esencial del cual se procedió a realizar las respectivas diluciones, para la primera dilución se empezó con una concentración máxima de 10000 ppm, hasta llegar a una concentración mínima final de 5 ppm, ya que la concentración de 0 ppm solo lleva metanol.

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

Tabla 4: Volumen necesario para dilución en aceite.

Volumen necesario para cada dilución.	
Concentración	Volumen de cada dilución
Concentración 1 (10000 ppm)	10 mg de aceite puro
Concentración 2 (1000 ppm)	5000 μL MeOH + 5 mg de aceite esencial
Concentración 3 (500 ppm)	2500 μL MeOH + 2500 μL de concentración 2
Concentración 4 (100 ppm)	4000 μL MeOH + 1000 μL de concentración 3
Concentración 5 (50 ppm)	2500 μL MeOH + 2500 μL de concentración 4
Concentración 6 (25 ppm)	2500 μL MeOH + 2500 μL de concentración 5
Concentración 7 (12,5 ppm)	2500 μL MeOH + 2500 μL de concentración 6
Concentración 8 (5 ppm)	3000 μL MeOH + 2000 μL de concentración 7
Concentración 9 (0 ppm)	5000 μL MeOH

Fuente: Investigación Experimental

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

El método ABTS+ fue desarrollado a partir de una solución patrón y una solución de trabajo ABTS+.

2.1.6.2.1 Solución patrón y de trabajo de ABTS+.

Para realizar 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 mg que se aforo a 25 mL con agua destilada. El segundo reactivo fue persulfato de potasio, del cual se pesó una cantidad de 7.028mg de igual manera se aforo a 25 mL 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 reposo, se tomó de esta solución una alícuota de 1 mL añadida a 60 mL de metanol, hasta obtener una absorbancia de 1.1 ± 0.02 a 734 nm. 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 Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) que es la capacidad antioxidante equivalente a Trolox. Se pesaron 25 mg del estándar Trolox y se aforo en un balón de 100 mL con metanol puro. En la tabla 5, se muestra la obtención de las diferentes alícuotas obtenidas a partir de esta solución.

Se tomarón 150 μL de cada dilución y 2850 μL de la solución de trabajo dejando que esta reaccione por 2 horas en la oscuridad, transcurrido ese tiempo se procedió a leer la absorbancia a 734 nm. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada concentración de Trolox y BHT respectivamente.

Tabla 5: Volumen necesario para cada dilución en Trolox.

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

Fuente: Investigación Experimental

2.1.6.2.3. Lectura de muestras.

Para determinar si el aceite esencial de *Annona cherimola* posee actividad antioxidante, se debe evaluar la muestra con suma precisión, por cada dilución que se realizó como para cada alícuota de Trolox.

De cada una de las soluciones preparadas anteriormente se tomarón 150 μL y se llevó a tubos de ensayo debidamente rotulados, en el que se le adició 2850 μL de la solución ABTS⁺ dando un volumen de 3 mL, se dejó reposar por dos horas en oscuridad y con ayuda del espectrofotómetro se procedió a la lectura de las muestras, las mismas que se midieron con una absorbancia de 734 nm. Cabe mencionar que este procedimiento se realizó por triplicada por cada una de las concentraciones del aceite esencial (ver Figura 25).



Figura 25: Muestras del aceite esencial de *Annona cherimola* analizadas mediante el método ABTS⁺.

Fuente: La autora

2.1.6.3. Método radical DPPH.

Para este método se procedió con la preparación de una solución patrón y de trabajo.

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 100 mL con metanol la misma que fue almacenada a -4 °C hasta su uso, de esta solución se tomó 10 mL y se adicionaron 45 mL de metanol obteniéndose la solución de trabajo; se midió la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm ajustándose hasta obtener una lectura de 1.1 ± 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 para 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 de *Annona cherimola* (ver tabla 4) y las diferentes concentraciones del estándar Trolox (ver tabla 5).

Cabe destacar que la parte experimental se realizó por triplicado de cada muestra diluida (ver Figura 26). De cada una de las muestras se transfirió 150 μL a un vial color ámbar para protegerlo de la luz. Este vial contiene también 2850 μL de la solución de trabajo de DPPH. El volumen final de cada vial debe ser de 3 mL, a estas muestras se las dejan reaccionar por 24 horas en la oscuridad y posteriormente se procede a la lectura de las mismas a una absorbancia de 515 nm.



Figura 26: Muestras del aceite esencial de *Annona cherimola*. analizadas mediante el método DPPH.

Fuente: La Autora

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 fórmula siguiente.

$$\%Inhibición = \%I = \frac{A - A_1}{A} \cdot 100 \quad (2)$$

Figura 27: Fórmula utilizada para calcular porcentaje de inhibición. A: Absorbancia del blanco. A1: Absorbancia de la muestra.
Fuente: (Muñoz Juárez & Gutiérrez, 2004).

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

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

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Extracción del aceite esencial de *Annona cherimola*.

Los valores del peso de cada destilación, así como la cantidad de aceite extraído se puede observar en la tabla 6.

Tabla 6: Cantidad (mL) de aceite esencial extraído de cada recolección de *Annona cherimola*.

Recolección	Peso (g)	Extracción (mL)
AC 1	5560	15 ml
AC 2	5160	13.5 ml
AC 3	4430	10 ml

AC: *Annona cherimola*.: **1** Primera recolección; **2** Segunda recolección; **3** Tercera recolección

Peso (g): peso de cada recolección

Extracción (mL): valor obtenido de aceite esencial de cada destilación

Fuente: La Autora

3.2. Propiedades Físicas

Las diferentes pruebas en las que se evaluaron las propiedades físicas del aceite esencial fueron:

3.2.1 Determinación del porcentaje de humedad de las hojas de *Annona cherimola*.

En la tabla 8 se puede apreciar el porcentaje de humedad de la materia vegetal. También se presenta el valor promedio (\bar{X}) y desviación estándar obtenidos de las tres recolecciones.

Tabla 7: Porcentaje de humedad en la *Annona cherimola*.

Recolecciones	Humedad (%)	\bar{X} (%)	σ
AC1	56.58		
AC2	56.79	53.26	5,95
AC3	46.41		

AC: *Annona cherimola*.: **1** Primera recolección; **2** Segunda recolección; **3** Tercera recolección

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

σ : Desviación estándar

Fuente: Investigación Experimental

Elaboración: La Autora

La humedad promedio obtenida de las tres recolecciones fue de 53.26 %. Sin embargo, se puede observar en la tabla la diferencia de porcentajes, donde el valor más alto de humedad corresponde a la segunda recolección (56.8 %), mientras que el valor más bajo corresponde a la tercera recolección (46.4 %), esta variación de la humedad podría deberse a las condiciones ambientales a las que se vio expuesta la materia vegetal. Sin embargo, los parámetros establecidos por las Farmacopeas para el contenido de humedad oscilan entre 8-14%, en lo que respecta al aceite esencial de *Annona cherimola* es superior al rango establecido, lo que significa que el método elegido para el secado (Lámpara Ultra X) de la planta no resulto el más idóneo, ya que no permitió extraer suficiente cantidad de agua de las hojas (Meza & Vargas, 2013).

3.2.2. Rendimiento del aceite esencial.

El rendimiento obtenido de las tres destilaciones por cada recolección se detalla en la tabla 9, así como su valor medio y desviación estándar.

Tabla 8: Rendimiento en % v/p del aceite esencial de las hojas de *Annona cherimola*.

Recolecciones	Rendimiento %	\bar{X} (%)	σ
AC1	0.27		
AC2	0.26	0.24	0.037
AC3	0.20		

AC: *Annona cherimola*: 1 Primera recolección; 2 Segunda recolección; 3 Tercera recolección
 \bar{X} : Media aritmética correspondiente a las diferentes repeticiones
 σ : Desviación estándar

Fuente: Investigación Experimental
Elaboración: La Autora

En las hojas de *Annona cherimola* el rendimiento obtenido fue de 0.24 % de aceite esencial. Este rendimiento fue calculado en relación al volumen de aceite y el peso de la materia vegetal. Como se menciona en (Del Pozo, 2006) la cantidad de aceite esencial que contiene una planta varía dependiendo de diversos factores, como son: periodo en el cual se recolecto la planta, lugar de crecimiento, variaciones genéticas de la planta, parte de la plante de la cual se va a extraer el aceite, entre otras. No obstante, se calcula que el rendimiento de los aceites esenciales que son obtenidos de las plantas es de alrededor del 0.01 al 10 %. El rendimiento del aceite esencial obtenido en este trabajo está en relación con los rangos reportados en la literatura.

3.2.3. Densidad relativa del aceite esencial.

En la tabla 9 están descritos los valores de la densidad obtenida de las tres destilaciones por cada recolección.

Tabla 9: Densidad relativa del aceite esencial de *Annona cherimola*.

Recolecciones	Densidad (g/cm ³)	\bar{X} (g/cm ³)	σ
AC1	0.9455		
AC2	0.9429	0,9472	0,0044
AC3	0,9532		

AC: *Annona cherimola*: 1 Primera recolección; 2 Segunda recolección; 3 Tercera recolección

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

σ : Desviación estándar

Fuente: Investigación Experimental

Elaboración: La Autora

Los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron los siguientes: el aceite esencial de mayor densidad fue de la tercera recolección (0,9532 g/cm³), y el de menor densidad fue la segunda recolección (0,9429 g/cm³).

Cabe mencionar que la densidad del aceite es menor a la del agua, siendo esta diferencia de densidades y de polaridades lo que permitió la separación del aceite esencial del agua después del proceso de destilación. La densidad de los aceites esenciales varía de 0.84 a 1.18 g/cm³ dependiendo de la especie y lugar de origen de la planta (Moposita & Nuñez, 2012). La densidad promedio del aceite esencial obtenido de las tres recolecciones fue de 0.9472 g/cm³ con una desviación estándar de 0.0044 (tabla 10). Demostrando que la especie *Annona cherimola* posee una buena calidad y pureza en su aceite esencial.

3.2.4. Índice de refracción del aceite esencial.

El valor promedio del índice de refracción obtenido de las tres recolecciones se muestra en la tabla 10.

Tabla 10: Índice de refracción del aceite esencial *Annona cherimola*.

Recolecciones	Índice de refracción	\bar{X}	σ
AC1	1,4712		
AC2	1,4742	1,4713	0,0023
AC3	1,4684		

AC: *Annona cherimola*: 1 Primera recolección; 2 Segunda recolección; 3 Tercera recolección
 \bar{X} : Media aritmética correspondiente a las diferentes repeticiones
 σ : Desviación estándar

Fuente: Investigación Experimental

Elaboración: La autora

El promedio general de los índices de refracción de cada muestra de aceite esencial de *Annona cherimola* fue de 1.4684 y 1.4713 con una desviación estandar de 0.0023. este índice de refracción es una constante característica de cada sustancia, representado la relación del seno del ángulo de incidencia de la luz y el de refracción cuando la luz pasa oblicuamente a través del medio (Barahona Calle, 2013). En su gran mayoría las esencias vegetales muestran índices de refracción entre 1,40 y 1,61 a 20 °C (Murillo, Fernández, & Sierra, 2004). Como se observa en la Tabla 11, el valor obtenido para el aceite esencial bajo estudio se encuentra dentro de los rangos establecidos.

3.2.5. Actividad óptica específica del aceite esencial.

En la tabla 11 se detalla el valor promedio de la actividad óptica obtenida en las tres recolecciones

Tabla 11: Actividad óptica del aceite esencial de *Annona cherimola*.

Recolecciones	Actividad Óptica	\bar{X}	σ
AC1	-62.82°		
AC2	-61.84°	-61.84°	0,80
AC3	-60.85°		

AC: *Annona cherimola*: 1 Primera recolección; 2 Segunda recolección; 3 Tercera recolección
 \bar{X} : Media aritmética correspondiente a las diferentes repeticiones
 σ : Desviación estándar

Fuente: Investigación Experimental

Elaboración: La autora

Como se puede apreciar en la tabla 12, el valor promedio de la actividad óptica es de $-61,84^\circ$, dicha actividad es dextrógira porque rota la luz polarizada en el sentido de las agujas del reloj, es decir es una sustancia ópticamente activa y no contiene algún tipo de adulteración en el aceite esencial (Weast, 2010).

3.3. Composición Química del aceite esencial de *Annona cherimola*.

Al analizar el aceite esencial obtenido de la especie *Annona cherimola*, tanto en la columna DB-5MS y HP-INNOWAX, se pudo realizar la verificación cuantitativa y cualitativa de los compuestos químicos respectivamente.

3.3.1. Análisis cualitativo y cuantitativo.

En la figura 28, se observa los cromatogramas obtenidos en CG-EM de las columnas DB5-MS y HP-INNOWAX del aceite esencial de la especie *Annona cherimola*. Cabe mencionar que en la parte superior de dichos picos aparecen números correspondientes a cada compuesto. La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG/MS), permitió la separación, identificación del aceite esencial estudiado. Los constituyentes están ordenados según su índice de retención (IR), indicando además su porcentaje de área (% A).

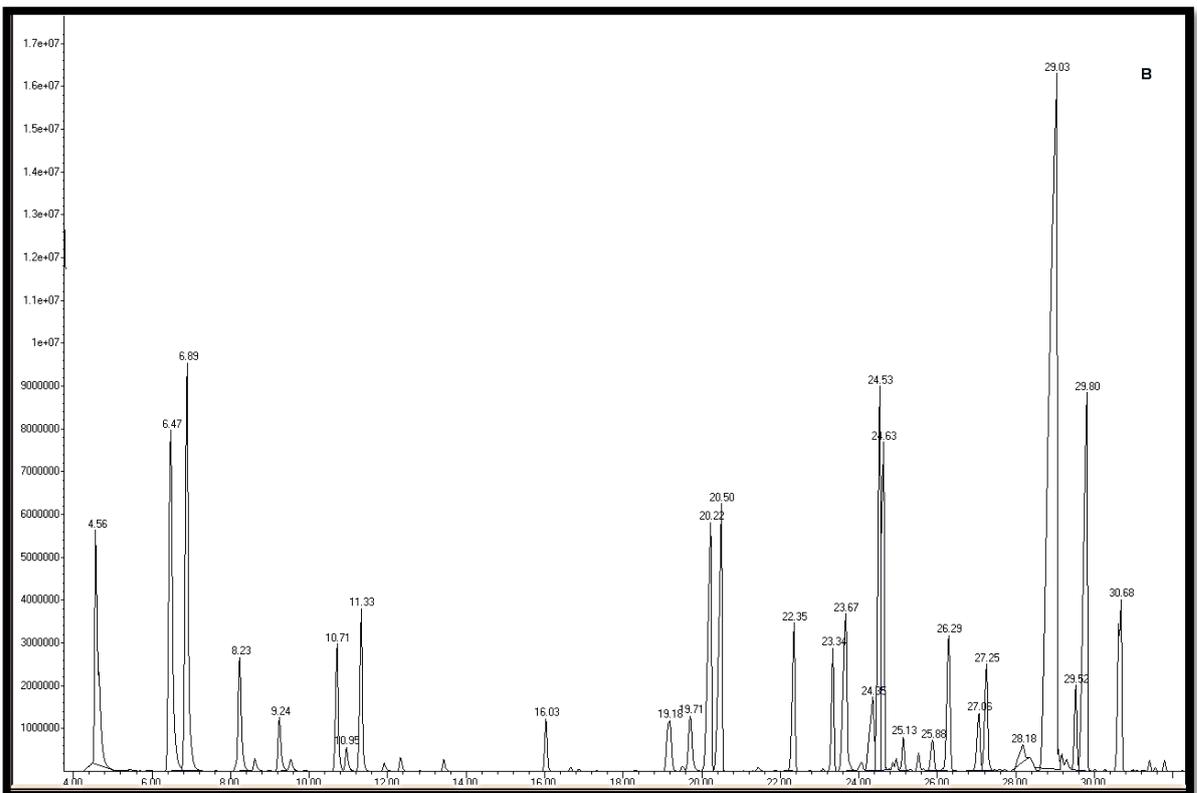
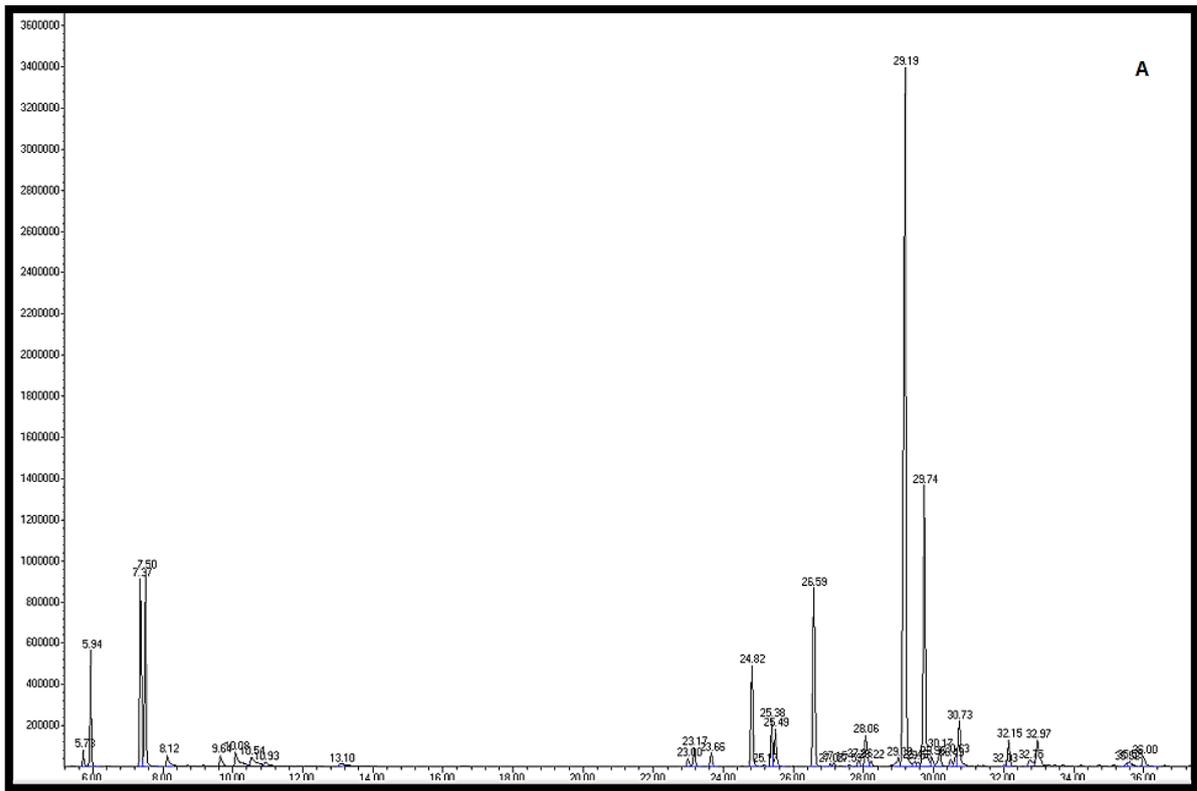


Figura 9: Perfil cromatográfico del aceite esencial de *Annona cherimola*. (A) columna no polar (DB5-MS); (B) columna polar (HP-Innowax)

Fuente: La Autora

La composición química del aceite esencial de *Annona cherimola*, se encuentra detallado en la tabla 12. Determinándose un total de 47 compuestos de los cuales se pudieron identificar 30 compuestos en ambas columnas con su respectivo índice de Kovats calculado y el índice obtenido en la literatura, que representan un 94.05 % para DB5-ms y un 93.73 % HP-Innowax, del porcentaje relativo total, dichos compuesto fueron: α -Thujene, α -Pinene, Sabinene, β -Pinene, β -Myrcene, Limonene, (Z)- β -Ocimene, (E)- β -Ocimene, γ -Terpinene, α -Terpinene, Bicycloelemene, δ -Elemene, α -Cubebene, α -Copaene, β -Cubebene, β -Elemene, (E)-Caryophyllene, γ -Elemene, Aromadendrene, α -Humulene, γ -Muurolene, Germacrene D, δ -Selinene, Bicyclogermacrene, α -Amorphene, α -Muurolene, Germacrene A, γ -Cadinene δ -Cadinene, β -Gurjunene, Elemol, Germacrene B, Nerolidol, Terpinen-4-ol, Germacrene D-4-ol, epi- α -Cadinol, α -Cadinol, epi α -Muurolol

Tabla 12: Composición Química del aceite esencial de la especie *Annona cherimola*.

Nº.	Compuestos	DB5-ms							HP INNOWAX-ms						
		IR ^{cal}	IR ^{ref}	% de Cantidad Relativa			\bar{x}	O	IR ^{cal}	IR ^{ref}	% de Cantidad Relativa			\bar{x}	O
				AC1	AC2	AC3					AC1	AC2	AC3		
1	α -Thujene	918	924 ^b	0,70	1,00	1,02	0,90	0,18	1042	1029 ^c	2,43	1,78	2,11	0,46
2	α -Pinene	923	932 ^b	4,74	3,73	3,92	4,13	0,54	1039	1032 ^d	5,42	3,36	3,59	4,12	1,13
3	Sabinene	959	969 ^b	6,95	10,89	10,25	9,36	2,12	1118	1124 ^e	7,12	9,81	9,90	8,94	1,58
4	β -Pinene	962	974 ^b	8,13	8,86	7,20	8,06	0,83	1103	1103 ^f	7,89	8,36	7,44	7,90	0,46
5	β -Myrcene	977	988 ^b	0,61	0,56	0,91	0,69	0,19	1159	1157 ^g	1,80	1,43	1,65	1,62	0,19
6	Limonene	1015	1024 ^b	0,60	0,43	0,65	0,56	0,12	1192	1192 ^h	0,78	0,60	0,67	0,68	0,09
7	(Z)- β -Ocimene	1024	1032 ^b	0,57	0,56	0,56	0,01	1232	1230 ⁱ	1,43	0,90	1,16	0,38
8	(E)- β -Ocimene	1035	1044 ^b	0,54	0,54	0,54	0,00	1249	1255 ^j	2,13	1,20	1,19	1,51	0,54
9	γ -Terpinene	1043	1054 ^b	0,27	0,26	0,23	0,25	0,02	1239	1232 ^k	0,39	0,88	0,63	0,63	0,24
10	α -Terpinene	1003	1014 ^b	0,18	0,14	0,13	0,15	0,03	1171	1172 ^l	0,34	0,87	0,66	0,62	0,27
11	Allo-Ocimene	1370	1380 ^m	0,50	0,32	0,41	0,13
12	Bicycloelemene	1311	1331 ^b	0,31	0,30	0,30	0,01	1476	1478 ⁿ	3,99	3,81	3,70	3,83	0,15
13	Elemene < δ ->	1315	1335 ^b	1,06	0,74	1,79	1,19	0,54	1461	1460 ^o	1,18	1,26	1,94	1,46	0,42
14	α -Cubebene	1326	1345 ^b	0,56	0,41	0,44	0,47	0,08	1448	1466 ^p	0,96	0,86	0,83	0,88	0,07
15	α -Copaene	1353	1374 ^b	3,97	2,79	2,64	3,13	0,73	1481	1477 ^q	3,70	3,12	2,58	3,13	0,56
16	β -Cubebene	1366	1387 ^b	1,70	1,29	1,31	1,43	0,23	1561	1573 ^r	2,35	2,29	1,85	2,17	0,27
17	β -Elemene	1368	1389 ^b	1,70	2,78	2,87	2,45	0,65	1582	1589 ^s	4,18	11,91	7,89	7,99	3,87
18	(E)-Caryophyllene	1394	1415 ^b	8,18	15,58	8,67	10,81	4,14	1592	1591 ⁱ	5,14	6,41	4,17	5,24	1,12
19	γ -Elemene	1407	1434 ^b	0,11	0,18	0,22	0,17	0,06	1631	1638 ^t	2,07	2,08	2,40	2,18	0,19
20	Aromadendrene	1425	1439 ^b	0,30	0,32	0,40	0,34	0,06	1608	1620 ^u	0,19	0,33	0,28	0,26	0,07
21	α -Humulene	1430	1452 ^b	1,79	2,78	1,81	2,13	0,57	1654	1650 ^g	1,56	2,48	1,54	1,86	0,54
22	Alloaromadendrene	1434	1455 ^b	0,16	0,22	0,19	0,19	0,03
23	γ -Muurolene	1452	1478 ^b	0,43	0,35	0,40	0,39	0,04	1682	1682 ^e	0,47	0,57	0,68	0,57	0,11
24	Germacrene D	1457	1484 ^b	35,05	26,39	28,10	29,85	4,59	1701	1704 ⁱ	24,33	19,37	21,79	21,83	2,48
25	δ -Selinene	1464	1475 ^b	0,26	0,44	0,35	0,12
26	Bicyclogermacrene	1470	1488 ^b	12,20	10,52	11,29	11,34	0,84	1726	1725 ^v	6,60	5,63	6,43	6,22	0,52
27	α -Amorphene	1492	1483 ^b	0,35	0,36	0,41	0,37	0,03	1676	1679 ^w	0,79	0,69	0,64	0,71	0,08
28	α -Muurolene	1476	1500 ^b	0,45	0,39	0,33	0,39	0,06	1713	1723 ^e	0,71	0,65	0,72	0,69	0,04

29	Germacrene A	1481	1474 ^b	1,01	1,71	1,59	1,44	0,37
30	γ-Cadinene	1489	1513 ^b	0,35	0,44	0,61	0,47	0,13
31	δ-Cadinene	1495	1486 ^b	2,09	1,55	1,56	1,73	0,31	1747	1752 ^q	2,44	2,43	2,01	2,29	0,25
32	β-Gurjunene	1405	1431 ^b	0,20	0,09	0,39	0,23	0,15
33	Elemol	1527	1548 ^b	0,12	0,11	0,22	0,15	0,06	2074	2085 ^e	0,38	0,39	0,49	0,42	0,06
34	Germacrene B	1530	1559 ^b	1,32	1,39	1,69	1,47	0,19	1812	1805 ^g	0,21	0,24	0,26	0,24	0,02
35	Nerolidol	1547	1565 ^b	0,05	0,70	0,37	0,46	2042	2050 ^x	2,28	1,22	1,33	1,61	0,58
36	Terpinen-4-ol	1598	1600 ^p	0,31	0,60	0,38	0,43	0,15
37	Germacrene D-4-ol	1552	1574 ^b	1,49	1,18	1,34	0,22
38	epi-α-Cadinol	1631	1640 ^b	0,65	0,53	0,11	0,43	0,28
39	α-Cadinol	2162	2171 ^h	0,48	0,29	0,53	0,43	0,13
40	epi-α-Muurolol	1620	1640 ^b	0,36	0,33	0,36	0,35	0,02	2222	2209 ^y	0,43	0,39	0,37	0,40	0,03
41	Valencene	1481	1496 ^b	1,26	1,01	1,14	0,18
42	Linalool	1551	1552 ^z	1,27	0,47	0,87	0,57
43	Spathulenol	2113	2120 ^h	0,30	0,29	0,30	0,01
44	α-Terpinolene	1276	1280 ^D	0,26	0,33	0,30	0,05
45	Viridiflorene	1682	1693 ^s	0,84	1,03	0,93	0,13
46	Endo-1-bourbonanol	2040	2048 ^E	1,75	2,37	2,06	0,44
47	Ledol	2013	2025 ^t	0,22	3,46	1,84	2,29
* TOTAL IDENTIFICADO									94,05	*TOTAL IDENTIFICADO					93,73

a = % 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

AC1= Aceites de la primera recolección; AC2= Aceites de la segunda recolección; AC3= Aceites de la tercera recolección

\bar{x} = Promedio

σ= Desviación estándar

IR^{cal} = Índice de Kóvats calculado

IR^{ref} = Índice de Kovats reportado en la literatura: ^bref.: (Adams, 2009); ^cref.: (Morochó et al., 2017); ^dref.: (Baser & Demirci, 2004); ^eref.: (Pino, Rodríguez, Beldarraín, & Blandariz, 2014); ^fref.: (Ruiz, Malagón, Zaragoza, & Valarezo, 2010); ^gref.: (Gancel et al., 2005); ^href.: (Santos et al., 2009); ⁱref.: (Judzentiene & Budiene, 2014); ^jref.: (Saikia et al., 2013); ^kref.: (Chahed, Dhifi, Mnif, Mhamdi, & Marzouk, 2012); ^lref.: (Lopes, Strobl, & Kolodziejczyk, 2005); ^mref.: (ben Taarit et al., 2010); ⁿref.: (Palá-Paúl, Copeland, Brophy, & Goldsack, 2006); ^oref.: (Gancel et al., 2003); ^pref.: (Kaul et al., 2005); ^qref.: (Flamini et al., 2006); ^rref.: (Amri et al., 2013); ^sref.: (Brophy, Goldsack, & O'Sullivan, 2004); ^tref.: (M'barek, 2016); ^uref.: (Elaissi et al., 2007); ^vref.: (Xavier et al., 2016); ^wref.: (Luana Riccobono et al., 2016); ^xref.: (In, Choi, & Kim, 2006); ^yref.: (L. Riccobono et al., 2016); ^zref.: (Smigielski, Raj, Krosowiak, & Gruska, 2009); ^Dref.: (Ismail, Mohsen, & Bassem, 2015); ^Eref.: (Jiang & Kubota, 2004).

Fuente: La Autora

En la Figura 29, se especifica los compuestos que presentan mayor porcentaje de aceite esencial de la especie *Annona cherimola* en la columna DB5-ms, los cuales son: Germacrene D (29,85 %); Bicyclogermacrene (11,34 %); (E)-Caryophyllene (10,81 %); Sabinene (9,36 %); β -Pinene (8,06 %); α -Pinene (4,13 %); α -Copaene (3,13 %); β -Elemene (2,45 %); α -Humulene (2,13 %); δ -Cadinene (1,73 %); Germacrene B (1,47 %); β -Cubebene (1,43 %); δ -Elemene (1,19 %).

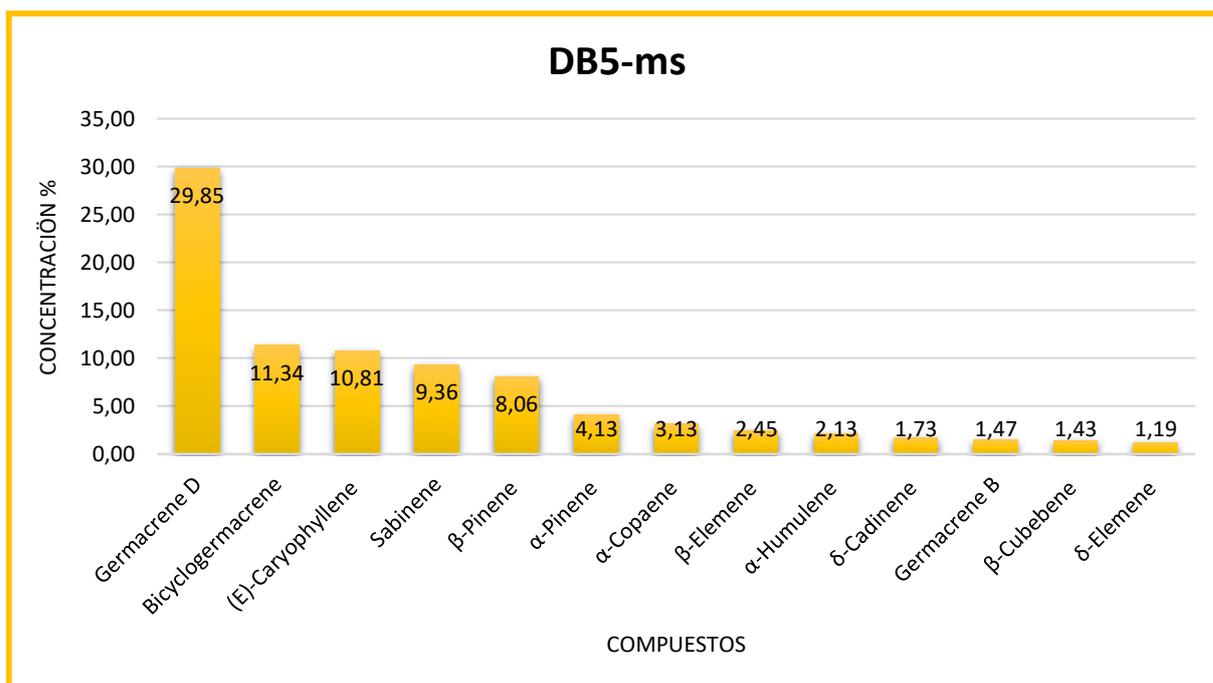


Figura 10: Compuestos mayoritarios en la columna no polar (DB5-ms).

Fuente: La Autora

En la Figura 30, se muestran los porcentajes de los compuestos mayoritarios obtenidos en la columna HP-Innowax entre estos compuestos tenemos: Germacrene D (21,83%); Sabinene (8,94%); β -Elemene (7,99%); Bicyclogermacrene (6,22%); (E)-Caryophyllene (5,24%); α -Pinene (4,12%); Bicycloelemene (3,83%); δ -Cadinene (2,29%); γ -Elemene (2,18%); β -Cubebene (2,17%); α -Thujene (2,11%); α -Humulene (1,86%); β -Myrcene (1,62%).

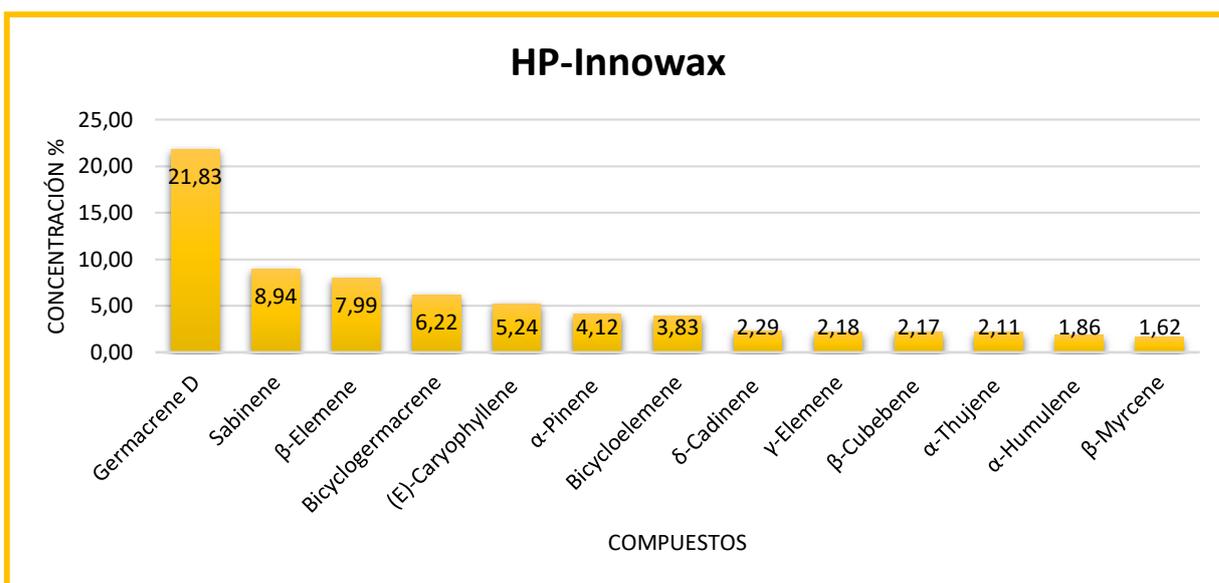


Figura 11: Compuestos mayoritarios en la columna no polar (HP-Innowax).

Fuente: La autora

Al realizar la comparación entre el porcentaje de cantidad relativa de los picos detectados en el detector de ionización de llama (FID) y 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, se puede realizar un análisis cuantitativo y cualitativo que resultó con la confirmación de la presencia de los compuestos identificados en el aceite esencial de las hojas de *Annona cherimola*.

Los resultados obtenidos de esta comparación son detallados en la tabla 13, en la que se puede observar los porcentajes de cantidad relativa por cada recolección así como el promedio total y la desviación estándar de los mismos.

Tabla 13: Comparación de la cantidad relativa (%) de los compuestos químicos del aceite esencial por CG-EM y CG-FID.

Nº	COMPUESTOS	DB5-ms										HP-Innowax									
		% de Cantidad Relativa						\bar{x}		σ		% de Cantidad Relativa						\bar{x}		σ	
		DP1		DP2		DP3						DP1		DP2		DP3					
		MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID
1	α -Thujene	0,70	0,72	1,00	1,04	1,02	1,01	0,90	0,92	0,17	0,17	2,43	1,76	1,78	1,85	2,11	1,81	0,46	0,06
2	α -Pinene	4,74	4,85	3,73	4,25	3,92	4,35	4,13	4,48	0,32	0,32	5,42	5,05	3,36	2,87	3,59	3,42	4,12	3,78	1,13	1,13
3	Sabinene	6,95	7,65	10,89	10,27	10,25	10,63	9,36	9,51	1,63	1,63	7,12	7,94	9,81	10,29	9,90	11,05	8,94	9,76	1,58	1,62
4	β ->Pinene	8,13	8,70	8,86	8,12	7,20	6,28	8,06	7,70	1,26	1,26	7,89	8,77	8,36	9,07	7,44	8,82	7,90	8,89	0,46	0,16
5	β -Myrcene	0,61	0,64	0,56	0,62	0,91	0,93	0,69	0,73	0,17	0,17	1,80	1,75	1,43	1,37	1,65	1,41	1,62	1,51	0,19	0,21
6	Limonene	0,60	0,60	0,43	0,44	0,65	0,67	0,56	0,57	0,12	0,12	0,78	0,70	0,60	0,60	0,67	0,67	0,68	0,66	0,09	0,05
7	(Z)- β -Ocimene	0,57	0,48	0,56	0,51	0,56	0,50	0,02	0,02	1,43	1,36	0,90	0,91	1,16	1,14	0,38	0,32
8	(E)- β -Ocimene	0,54	0,65	0,54	0,58	0,54	0,61	0,05	0,05	2,13	2,11	1,20	1,10	1,19	1,17	1,51	1,46	0,54	0,56
9	γ -Terpinene	0,27	0,29	0,26	0,25	0,23	0,25	0,25	0,26	0,03	0,03	0,39	0,38	0,88	0,97	0,63	0,64	0,63	0,67	0,24	0,30
10	α -Terpinene	0,18	0,20	0,14	0,13	0,13	0,55	0,15	0,29	0,22	0,22	0,34	0,33	0,87	0,86	0,66	0,65	0,62	0,61	0,27	0,27
11	Allo-Ocimene	0,50	0,49	--	0,32	0,32	0,41	0,40	0,13	0,12
12	Bicycloelemene	0,31	0,32	0,30	0,28	0,30	0,30	0,17	0,03	3,99	3,12	3,81	3,55	3,70	2,77	3,83	3,15	0,15	0,39
13	δ -Elemene	1,06	1,11	0,74	1,16	1,79	1,90	1,19	1,39	0,45	0,45	1,18	1,15	1,26	1,11	1,94	1,70	1,46	1,32	0,42	0,33
14	α -Cubebene	0,56	0,56	0,41	0,47	0,44	0,44	0,47	0,49	0,06	0,06	0,96	0,83	0,86	0,80	0,83	0,82	0,88	0,81	0,07	0,01
15	α -Copaene	3,97	3,66	2,79	2,94	2,64	2,49	3,13	3,03	0,59	0,59	3,70	2,58	3,12	2,68	2,58	2,09	3,13	2,45	0,56	0,31
16	β -Cubebene	1,70	1,78	1,29	0,92	1,31	1,40	1,43	1,37	0,43	0,43	2,35	1,93	2,29	1,85	1,85	1,73	2,17	1,84	0,27	0,10
17	β -Elemene	1,70	1,75	2,78	2,56	2,87	2,98	2,45	2,43	0,63	0,63	4,18	3,51	11,91	13,42	7,89	7,81	7,99	8,25	3,87	4,97
18	(E)-Caryophyllene	8,18	8,98	15,58	17,04	8,67	7,73	10,81	11,25	5,05	5,05	5,14	5,34	6,41	5,99	4,17	3,67	5,24	5,00	1,12	1,20
19	γ -Elemene	0,11	0,21	0,18	0,13	0,22	0,24	0,17	0,19	0,05	0,05	2,07	2,05	2,08	1,76	2,40	1,77	2,18	1,86	0,19	0,17
20	Aromadendrene	0,30	0,32	0,32	0,31	0,40	0,46	0,34	0,36	0,08	0,08	0,19	0,16	0,33	0,32	0,28	0,28	0,26	0,26	0,07	0,08
21	α -Humulene	1,79	1,98	2,78	2,94	1,81	2,00	2,13	2,31	0,55	0,55	1,56	1,43	2,48	2,05	1,54	1,37	1,86	1,62	0,54	0,38
22	Alloaromadendrene	0,16	0,26	0,22	0,27	0,19	0,19	0,19	0,24	0,04	0,04
23	γ -Muuroolene	0,43	0,43	0,35	0,23	0,40	0,53	0,39	0,40	0,15	0,15	0,47	0,45	0,57	0,55	0,68	0,37	0,57	0,45	0,11	0,09
24	Germacrene D	35,05	31,99	26,39	27,82	28,10	27,89	29,85	29,23	2,39	2,39	24,33	25,81	19,37	20,50	21,79	23,33	21,83	23,21	2,48	2,66
25	δ -Selinene	0,26	0,281	0,44	0,46	0,35	0,37	0,13	0,13

26	Bicyclogermacrene	12,20	10,82	10,52	9,67	11,29	10,94	11,34	10,47	0,70	0,70	6,60	8,40	5,63	6,89	6,43	8,12	6,22	7,80	0,52	0,81				
27	α-Amorphene	0,35	0,34	0,36	0,35	0,41	0,41	0,37	0,37	0,04	0,04	0,79	0,76	0,69	0,65	0,64	0,54	0,71	0,65	0,08	0,11				
28	α-Muurolene	0,45	0,46	0,39	0,41	0,33	0,33	0,39	0,40	0,07	0,07	0,71	0,86	0,65	0,60	0,72	0,87	0,69	0,78	0,04	0,15				
29	Germacrene A	1,01	1,05	1,71	1,71	1,59	1,81	1,44	1,52	0,41	0,41				
30	γ-Cadinene	0,35	0,36	0,44	0,40	0,61	0,62	0,47	0,46	0,14	0,14				
31	δ-Cadinene	2,09	2,36	1,55	1,79	1,56	1,69	1,73	1,95	0,36	0,36	2,44	2,18	2,43	1,68	2,01	1,59	2,29	1,81	0,25	0,32				
32	β-Gurjunene	0,20	0,31	0,09	0,09	0,39	0,20	0,23	0,20	0,11	0,11				
33	Elemol	0,12	0,12	0,11	0,11	0,22	0,18	0,15	0,14	0,04	0,04	0,38	0,37	0,39	0,38	0,49	0,52	0,42	0,42	0,06	0,08				
34	Germacrene B	1,32	1,36	1,39	1,67	1,69	1,82	1,47	1,61	0,23	0,23	0,21	0,20	0,24	0,25	0,26	0,27	0,24	0,24	0,02	0,04				
35	Nerolidol	0,05	0,10	0,70	0,73	0,37	0,41	0,45	0,45	2,28	2,12	1,22	1,21	1,33	1,23	1,61	1,52	0,58	0,52				
36	Terpinen-4-ol	0,31	0,32	0,60	0,55	0,38	0,36	0,43	0,41	0,15	0,13				
37	Germacrene D-4-ol	1,49	1,28				
38	epi-α-Cadinol	0,65	0,67	0,53	0,58	0,11	0,29	0,43	0,51	0,20	0,20				
39	α-Cadinol	0,48	0,49	0,29	0,29	0,53	0,47	0,43	0,42	0,13	0,11				
40	epi-α-Muurolol	0,36	0,37	0,33	0,36	0,42	0,35	0,39	0,03	0,03	0,43	0,28	0,39	0,37	0,37	0,27	0,40	0,30	0,03	0,06				
41	Valencene	1,26	1,37	1,01	1,08	1,14	1,22	0,20	0,20				
42	Linalool	1,27	1,27	0,47	0,78	0,87	1,03	0,57	0,35				
43	Spathulenol	0,30	0,28	0,29	0,27	0,30	0,27	0,01	0,01				
44	α-Terpinolene	0,26	0,25	0,33	0,33	0,30	0,29	0,05	0,06				
45	Viridiflorene	0,84	0,74	1,03	0,64	0,93	0,69	0,13	0,07				
46	Endo-1-bourbonanol	1,75	1,62	2,37	1,72	2,06	1,67	0,44	0,07				
47	Ledol	0,22	0,22	3,46	3,07	1,84	1,65	2,29	2,02				
**TOTAL IDENTIFICADO								94,05	91,77	**TOTAL IDENTIFICADO								85,40	90,89						

Compuestos según el orden de elución de la columna DB5-ms

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

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

AC1: Aceites de la primera recolección **AC2:** Aceites de la segunda recolección **AC3:** Aceites de la tercera recolección

X: Promedio

O: Desviación estándar

Fuente: La Autora

Ya que al no haber estudios previos de los compuestos químicos de la especie *Annona cherimola*, así como tampoco del género, no se descarta la posibilidad de que en un futuro existieran un sinnúmero de investigaciones que llevaran como objetivo el estudio de la composición química del aceite esencial de varias especies del género.

Como se reporta en Zekaria, (2007), los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales pueden llegar a constituir hasta un 85 % del total, mientras que el resto se presentan como trazas, es por ello que la concentración del compuesto concreto en el total de la mezcla de aceites de la planta puede ser muy variables. Estudios demuestran que son muchos los factores que influyen en la composición química de un aceite esencial, entre los que se destacan: el origen, la especie y el órgano de la planta, así como la destilación y la forma de almacenamiento del aceite esencial.

3.4. Actividad biológica del aceite esencial de *Annona cherimola*.

El método utilizado para evaluar la actividad antimicrobiana permitió medir la susceptibilidad in vitro de los microorganismos frente a agentes antimicrobianos determinando la potencia de la sustancia, la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas de una droga de origen vegetal y la concentración de la droga en el organismo humano.

3.4.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana.

En la tabla 14 se puede observar la CMI antibacteriana de los aceites obtenidos en cada recolección frente a 6 cepas bacterianas Gram-negativas y una cepa Gram-positiva.

Tabla 14: CMI antibacteriana ($\mu\text{g/ml}$) del aceite esencial frente a 7 cepas bacterianas.

Concentración mínima inhibitoria de <i>Annona Cherimola</i> mg/mL							
Aceite Esencial	Gram-negativas						Gram-positivas
	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 9997	<i>Salmonella entérica</i> ATCC 29212	<i>Salmonella typhimurium</i> (LT2)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
AC 1	>1000	>1000-	>1000	>1000	>1000	>1000	5 mg/mL
AC 2	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	10 mg/mL
AC 3	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	10 mg/mL
Antibiótico: Tetraciclina ug/ml	7,813	15,625	1,953	1,953	1.953	3,906	1,953

Fuente: La autora

La actividad biológica del aceite esencial de *Annona cherimola* frente a las diferentes cepas bacterianas Gram-negativas y Gram-positivas resulto negativo, esto se debe a que su CMI es mayor a 1000 $\mu\text{g/ml}$, lo que significa la ausencia de crecimiento bacteriano debido a que el método de dilución del aceite esencial favorece la entrada del aceite al interior de los microorganismos inhibiendo completamente su crecimiento, además de la presencia de bajas cantidades de α -Pinene, β -Pinene, (E)-Caryophyllene y α -Cadinol, sustancias para las que se ha reportado actividad antibacteriana.

Muchos estudios destacan que en los aceites esencial existe una gran variedad de compuestos, ya que es probable que su actividad antimicrobiana no se atribuya a un mecanismo específico, sino a la acción combinada de varios de ellos sobre distintas partes de la célula. Por lo general estos aceites esenciales suelen ser más activos frente a bacterias Gram-positivas que frente a las Gram-negativas, esto se debe a la influencia de la estructura de la pared celular, la composición de la membrana externa de las bacterias y su interacción con los aceites esenciales, de naturaleza lipofílica (Zekaria, 2007).

En la actualidad no se han reportado investigaciones del aceite esencial de *Annona cherimola* sobre bioactividad contra estas cepas bacterianas las mismas que son en su mayoría causantes de infecciones frecuentes en humanos, y se adaptan a una gran variedad de sustratos entre los cuales están las fuentes de carbono y nitrógeno.

3.5. Actividad antioxidante del aceite esencial de *Annona cherimola*.

La aplicación de los dos métodos espectrofotómetros: ABTS⁺ y DPPH, nos permitió evaluar la actividad antioxidante del aceite esencial de *Annona cherimola*.

3.5.1. Método ABTS⁺.

3.6.1.1. Lectura de las muestras del estándar de referencia TROLOX.

En la tabla 15 se puede observar los porcentajes respectivos de disminución para cada concentración. a partir del uso del estándar de referencia Trolox y con la ayuda del equipo de espectrofotometría, se pudo obtener las absorbancias, las mismas que fueron reemplazadas con la fórmula de porcentaje de inhibición (Figura 27).

Tabla 15: Datos del método ABTS⁺ para el estándar TROLOX.

DATOS ABTS		
Trolox		
Concentración (ppm)	Absorbancia Determinada	Porcentaje de Disminución (%)
1000	0.0443	96.03
800	0.187	83.31
600	0.38	66.01
450	0.555	50.4
300	0.726	35.15
150	0.899	19.63
25	1.022	8.66
0	1.002	10.42
Absorbancia de solución de trabajo de 1.118		

Fuente: La Autora

3.6.1.2. Lectura de las muestras del aceite esencial.

La determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial *Annona cherimola* es posible observar en la tabla 16, con sus respectivas concentraciones y a su vez el porcentaje de disminución.

Tabla 16: Datos del método ABTS+ para el aceite esencial.

DATOS ABTS		
Aceite de <i>Annona cherimola</i> (chirimoya)		
Concentración (ppm)	Absorbancia Determinada	Porcentaje de Disminución (%)
10000	0.1167	89.57
1000	0.927	17.13
500	1.041	7.0003
250	0,983	12.12
100	0.981	12.33
50	1.042	6.91
25	1.001	10.57
12.5	0.995	11.11
5	1.003	10.4
0	0.999	10.72
Absorbancia de solución de trabajo de 1.118		

Fuente: La Autora

3.5.2. Método DPPH.

Los resultados obtenidos nos permiten comprobar la actividad antioxidante presente en el aceite esencial de *Annona cherimola*. a una concentración de 10000 ppm el resultado del porcentaje de disminución fue de 89.57 % y de la concentración de 1000 ppm de 17.13 %, que comparada a los valores frente al radical ABTS donde se usaron estándares de referencia en el cual su concentración máxima fue de 10000 ppm con porcentaje de disminución de 96.03 %. Es así, que los aceites esenciales necesitan un porcentaje igual o mayor al 50 % de disminución para poder especificar la presencia de actividad antioxidante.

3.6.2.1. Lectura de las muestras del estándar de referencia TROLOX.

En la tabla 17 se muestran los datos obtenidos mediante el método de radical DPPH; lo cuales fueron analizados de manera similar a los datos obtenidos por el método ABTS⁺, la evaluación de las concentraciones en el espectrofotómetro arrojó datos de absorbancia, con los que se determinó el porcentaje de disminución del estándar de referencia TROLOX para cada concentración establecida. Para este análisis se utilizó la fórmula de la figura 25 que se encuentra detallada en el capítulo II.

Tabla 17: Datos del método DPPH para el estándar TROLOX.

DATOS DPPH		
Trolox		
Concentración (ppm)	Absorbancia Determinada	Porcentaje de Disminución (%)
1000	0	100
800	0	99.97
600	0.095	91.51
450	0.339	69.67
300	0.594	46.91
150	0.809	27.67
25	0.995	11.08
0	1.026	8.31
Absorbancia de solución de trabajo de 1.119		

Fuente: La Autora

3.6.2.2. Lectura de las muestras del aceite esencial de *Annona cherimola*.

La determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Annona cherimola* a diferentes concentraciones como se puede observar en la tabla 18. Comprobando a la vez el porcentaje de disminución.

Tabla 18: Datos del método DPPH para el aceite esencial.

DATOS DPPH		
Aceite		
Concentración (ppm)	Absorbancia Determinada	Porcentaje de Disminución (%)
10000	0.001	99.91
1000	0.042	96.22
500	0.234	79.12
250	0.528	52.82
100	0.791	29.31
50	0.898	19.75
25	0.955	14.66
12,5	0.987	11.83
5	1.002	10.49
0	1.012	9.56
Absorbancia de solución de trabajo de 1.119		

Fuente: La Autora

Se puede observar que, en los resultados obtenidos de la especie en estudio, el aceite esencial de *Annona cherimola* presentó mayor actividad antioxidante de 99.91 % a una concentración de 10000 ppm y 96.22 % a una concentración de 1000 ppm en comparación con el estándar Trolox que presentó 100 % de porcentaje de disminución. Como se menciona en Ramos Llica et al., (2008) existen diferentes métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya se *in vitro* o *in vivo*, pero el método DPPH es uno de los más utilizados ya que presenta una excelente estabilidad en ciertas condiciones por presentar un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, por el contrario del ABTS+ que tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química, enzimática o electroquímica.

Según lo reportado en (Vit & Santiago, 2014) hay flavonoides, polifenoles y proteínas más polares en hojas, pulpa y semilla de la guanábana, lo cual también explicaría una mayor actividad antioxidante en los extractos etanólicos que en los metanólicos. Los resultados demostrados en este trabajo de investigación se encuentran en concordancia con los presentados por Ramírez y Pacheco de Delahaye (2011) en cuanto al contenido de polifenoles, donde se sugiere que los compuestos fenólicos de las Annonaceas, en particular de los extractos metanólicos y etanólicos que pueden ser utilizados como antioxidantes naturales en la dieta.

CONCLUSIONES

- El volumen obtenido de aceite esencial de *Annona cherimola* mediante destilación por arrastre de vapor presento propiedades físicas que reflejan un buen porcentaje en el rendimiento: 0,24%, densidad relativa: 0,9472 g/cm³; valor medio de índice de refracción: 1,4713; y actividad óptica: -61, 84°.
- Se identificaron 30 compuestos para ambas columnas, obteniendo en la columna DB-5ms el 94,047% y en la columna HP-Innowax con un porcentaje de identificación de 93,73%. Donde los compuestos mayoritarios resultaron ser: Germacrene D (29,85 %); Bicyclogermacrene (11,34%); (E)-Caryophyllene (10,81%); Sabinene (9,36%); β-Pinene (8,06%); α-Pinene (4,13%); α-Copaene (3,13%); β-Elemene (2,45%); α-Humulene (2,13%); δ-Cadinene (1,73%); Germacrene B (1,47%); β-Cubebene (1,43%); δ-Elemene (1,19%).
- La actividad antimicrobiana fue evaluada mediante el método de microdilución en caldo, posteriormente se calculó la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) la cual reflejó que las bacterias Gram (-) y bacterias Gram (+) no registraron halos de inhibición en concentraciones de aceite esencial de demostrando que la actividad antimicrobiana es inactiva frente al referente natural.
- El aceite esencial de *Annona cherimola* mostro porcentajes de actividad antioxidante significativamente alto con valores de 89,57% para ABTS+ y del 99.91% para DPPH, que podría considerarse el uso del aceite esencial de *Annona cherimola* en formulaciones fitofarmacéuticas.

RECOMENDACIONES

- Sería necesario tener en consideración los tiempos, lugar, tipo de suelo y estación del año para realizar la recolección, así como el tratamiento pos-cosecha (impurezas o residuos ajenos) a la materia vegetal recolectada antes de procederá destilar, así podremos evitar complicaciones con la determinación química de la especie
- Debido a la gran cantidad de Germacrene D (29,85%), se recomienda evaluar otras especies de patógenos Gram (+) y Gram (-) así como en hongos, para probar la actividad biológica de los aceites esenciales este tipo de especie.
- Se debería realizar estudios de las diferentes especies de *Annonaceae* para un análisis de sus componentes químicos y así servir de aporte beneficioso tanto en el ámbito industrial, farmacéutico, etc.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, R. P. (2009). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/mass Spectroscopy* (4, illustr ed.). Allured Publishing Corporation, 2007.
- AFNOR, (1982). (ISO 279:1998), Aceites esenciales. Determinación de la densidad Relativa a 20°C. Método de referencia
- AFNOR , (1988). (ISO 280:1998), Aceites esenciales. Determinación del índice de refracción. Método de Referencia
- Aguilar, E., & López, A. (2013). Extractos y aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y su potencial aplicación como agentes antimicrobianos en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(2), 35–41.
- Agustín, J. A., & Ledesma, S. D. S. (2014). *Conservación y uso de los recursos genéticos de Annonaceae en México. Revista Brasileira de Fruticultura* (Vol. 36).
- Amri, I., Hamrouni, L., Hanana, M., Gargouri, S., Fezzani, T., & Jamoussi, B. (2013). Chemical composition, physico-chemical properties, antifungal and herbicidal activities of *Pinus halepensis* Miller essential oils. *Biological Agriculture & Horticulture*, (February), 1–16.
- Andrews, J. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1, 5–16.
- Armijos, C. (2015). Plantas sagradas de la ètnica Saraguro con poder de sanación. *Departamento de Química de La UTPL.*, 2.
- Balslev, H., Navarrete, H., Torre, L. De, & Macía, M. J. (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador, 1–3.
- Barahona Calle, V. C. (2013). "Evaluación de la actividad antioxidante y valor nutracéutico de las hojas y frutos de la Guanábana (*Annona muricata*)," 54–142.
- Baser, K. H. C., & Demirci, B. (2004). The essential oil of *Senecio farfarifolius* Boiss. et Kotschy growing in Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 16(6), 558–559.
- ben Taarit, M., Msaada, K., Hosni, K., Ben Amor, N., Marzouk, B., & Kchouk, M. E. (2010). Chemical composition of the essential oils obtained from the leaves, fruits and stems of *Salvia verbenaca* L. from the northeast region of Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*, 22(5), 449–453.
- Benitez, A. (2017). Area de recolección de la especie *Annona cherimola*. *Museo Del Loja-Ecuador*.
- Brophy, J. J., Goldsack, R. J., & O'Sullivan, W. (2004). Chemistry of the Australian gymnosperms: Part VII. The leaf oils of the genus *Actinostrobus*. *Biochemical*

Systematics and Ecology, 32(10), 867–873.

Burneo Vivar, M. L. (2012). Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de ascaridol en el extracto hexánico de *Chenopodium ambrosioides* (paico) mediante cromatografía de gases – FID. *UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA La Universidad Católica de Loja*, 9–33.

Cabrera Arriaca, J. de D. (2014). “Caracterización de una gasolina (NAFTA LIGERA) mediante cromatografía de gases.” *UNIVERSIDAD VERACRUZANA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS*, 7–42.

Calderón Hernández, J. A. (2011). Caracterización fitoquímica, actividad antibacteriana y Antioxidante de extractos de plantas medicinales utilizadas en PEREIRA y SANTA ROSA de CABAL (RISARALDA). *Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología Escuela de Tecnología Química*, 75.

Chahed, T., Dhifi, W., Mnif, W., Mhamdi, B., & Marzouk, B. (2012). Changes in Essential Oil Composition During Pistacia vera Leaves Development in Sfax Region (Tunisia). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15(4), 602–608.

Correa Conza, M. J. (2014). *Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de Hedyosmum racemosum (Ruiz & Pav.) G. Don de la familia Chloranthaceae de la provincia de Loja, a partir de individuos con flores fem.* Universidad Técnica Particular de Loja.

da Silva Lima, S. C., Oliveira de Arruda, G., Rogério, D. R., & Martins Alvarenga, M. R. (2012). Representaciones y usos de las plantas medicinales en mayores. *Latino. Am. Enfermagem*, 20(4). Retrieved from http://www.scielo.br/pdf/rlae/v20n4/es_19.pdf

Del Pozo, X. A. (2006). Extracción, caracterización y determinación de la actividad antibacteriana y antimicótica del aceite esencial de Hierba Luisa (*Cymbopogon Citratus* (DC) stapf), 41–162.

Elaissi, A., Chraif, I., Bannour, F., Farhat, F., Ben Salah, M., Chemli, R., & Khouja, M. L. (2007). Contribution to the qualitative and quantitative study of seven Eucalyptus species essential oil harvested of Hajeb's Layoun arboreta (Tunisia). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 10(1), 15–25.

FAO. (2011). *Escherichia coli*. *Boletín de Enfermedades Transfronterizas de Los Animales*, 39.

Flamini, G., Tebano, M., Cioni, P. L., Bagci, Y., Dural, H., Ertugrul, K., ... Savran, A. (2006). A multivariate statistical approach to *Centaurea* classification using essential oil composition data of some species from Turkey. *Plant Systematics and Evolution*, 261(1–4), 217–228.

Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. (2013). *Staphylococcus Aureus*. *Elika*, 1–4.

- Gancel, A. L., Ollitrault, P., Froelicher, Y., Tomi, F., Jacquemond, C., Luro, F., & Brillouet, J. M. (2003). Leaf volatile compounds of seven citrus somatic tetraploid hybrids sharing willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) as their common parent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(20), 6006–6013.
- Gancel, A. L., Ollitrault, P., Froelicher, Y., Tomi, F., Jacquemond, C., Luro, F., & Brillouet, J. M. (2005). Leaf volatile compounds of six citrus somatic allotetraploid hybrids originating from various combinations of lime, lemon, citron, sweet orange, and grapefruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(6), 2224–2230.
- Gómez Álvarez, R. (2012). Plantas medicinales en una aldea de Tabasco, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, *35*(1), 43–49.
- Gutierrez, M. C., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter Del Instituto de Investigacion Textil Y de Cooperacion Industrial*, (122), 35–41.
- Guzmán Armas, S. C. (2011). "Análisis de la afección de la biopiratería en especímenes de flora y fauna del Ecuador: Casos de estudio." *ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES "UTPL"*, 1–97.
- In, H. C., Choi, H. K., & Kim, Y. S. (2006). Difference in the volatile composition of pine-mushrooms (*Tricholoma matsutake* Sing.) according to their grades. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(13), 4820–4825.
- Ismail, A., Mohsen, H., & Bassem, J. (2015). Chemical composition of *Thuja orientalis* L. essential oils and study of their allelopathic potential on germination and seedling growth of weeds. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, (July), 1–10.
- Jiang, L., & Kubota, K. (2004). Differences in the volatile components and their odor characteristics of green and ripe fruits and dried pericarp of Japanese pepper (*Xanthoxylum piperitum* DC.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(13), 4197–4203.
- Judzentiene, A., & Budiene, J. (2014). Variability of *Artemisia campestris* L. essential oils from Lithuania. *Journal of Essential Oil Research*, *26*(5), 328–333.
- Jurado Jiménez, R., Arenas Muñoz, C., Doblas Delgado, A., Rivero, A., & Torre-Cisneros, J. (2010). Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. *Medicine*, *10*(52), 3497–3501.
- Kaul, P. N., Rao, B. R. R., Singh, K., Bhattacharya, A. K., Mallavarapu, G. R., & Ramesh, S. (2005). Volatile constituents of essential oils isolated from different parts of *Alpinia calcarata* Rosc. *Journal of Essential Oil Research*, *17*(1), 7–9.
- LLoria, M. (2009). Manejo de las Infecciones por organismos multirresistentes. *Sociedad Argentina de Terapia Intensiva. Comité de Infectología Crítica.*, 1–20.

- Londoño Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. *Corporación Universitaria Lasallista*, 129–162.
- Lopes, D., Strobl, H., & Kolodziejczyk, P. (2005). Influence of Drying and Distilling Procedures on the Chemical Composition of Valerian Oil (*Valeriana officinalis* L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 8(2), 134–139.
- López Luenco, M. T. (2004). Los aceites esenciales: aplicaciones farmacológicas, cosméticas y alimentarias., 23, 88–91.
- M'barek, K. (2016). Chemical Composition and Phytotoxicity of *Cupressus sempervirens* Leaves Against Crops. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(7), 1582–1599.
- Maguna, F. P., Romero, A. M., Garro, O. A., & Okulik, N. B. (2006). Actividad antimicrobiana de un grupo de Terpenoides . *Facultad de Agroindustria UNNE*, 1(E-057), 1–4.
- Martínez Álvarez, No. (2007). Virulencia , resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella enterica*. *Departamento de Biología Funcional. Área de Microbiología*, 202.
- Meza, K., & Vargas, G. (2013). Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus* (DC) STAPF), Poaceae en una formulación cosmética con finalidad antiacnéica. *UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE QUITO*.
- Mollinedo Patzi, M. A., & Gonzáles Villalobos, C. (2014). Bacterias Gram Negativas. *Revista de Actualización Clínica Volumen*, 49, 2609–2613.
- Montoya Cadavid, G. de J. (2010). ACEITES ESENCIALES: una alternativa de diversificación para el eje cafetero. *Sección de Publicaciones E Imagen Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales*, 1, 12–174.
- Moposita, D., & Nuñez, D. (2012). *Obtención de aceites esenciales de la cáscara de naranja a través del metodo de destilacion por arrastre de vapor, utilizando tres concentraciones de bicarbonato de sodio para incrementar su rendimiento*. UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR.
- Morocho, V., Luisa Toro, M., Cartuche, L., Guaya, D., Valarezo, E., Malagon, O., & Ramirez, J. (2017). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Lepechinia radula* Benth Epling. *RECORDS OF NATURAL PRODUCTS*, 11(1), 57–62.
- Muñoz Juárez, M. A., & Gutiérrez, D. M. (2004). Determinación de actividad antioxidante de diversas partes del árbol *Nicotiana Glauca*. *Songklanakarín Journal of Science and Technology*, 26(2), 1–4.
- Murillo, E., Fernández, K., & Sierra. (2004). Caracterización físico-química del esencial de Albahaca. II. *Revista Colombiana de Química*, 33(2), 139–148.

- Navarrete, C., Gil, J., Durango, D., & Garcia, C. (2009). Extracción y caracterización del aceite esencial de manarina obtenido de residuos agroindustriales. *Dyna*, 162(1), 85–92.
- Navarro Beltrán, M. A. (2012). Potencial de los aceites esenciales de Toronjil (*Melissa officinalis*), Orégano (*origanum vulgare* L) y Bleo (*Pereskia bleo*), para ser utilizados como saborizantes en aceites comestibles de mesa., 17–84.
- Ortiz Rodriguez, A. E., Sosa, V., & Ruiz Sanchez, E. (2015). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. *Instituto de Ecología A.C*, 1–18.
- Palá-Paúl, J., Copeland, L. M., Brophy, J. J., & Goldsack, R. J. (2006). Essential oil composition of two variants of *Prostanthera lasianthos* Labill. from Australia. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(1), 48–55.
- Paredes Punina, D. O., & Quinatoa Chicaiza, F. D. (2010). “Desarrollo de un sistema de extracción de aceites esenciales,” 1–191.
- Parrales, A., Reyes, M., & Pine, W. (2012). *Cromatografía del gas natural*.
- Peredo Luna, H., Palou García, E., & López Malo, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*.
- Pérez, M., & Mota, M. (2010). Morfología y estructura bacteriana. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, 49, 1–9.
- Pérez Lainez, M. D. (2014). Perfil fitoquímico del aceite esencial del fruto TEJOCOTE MEXICANO (*Crataegus* spp.), 15–121.
- Pino, J. A., Rodríguez, D. K., Beldarraín, T., & Blandariz, S. R. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Licaria triandra* (Sw.) Kosterm. leaves from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*, 26(August 2014), 263–266.
- Ramos Llica, E., Castañeda Castañeda, B., & Ibañez Vásquez, L. A. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Revista Académica Perú Salud*, 15(1), 42–46.
- Riccobono, L., Maggio, A., Bruno, M., Bancheva, S., Santucci, O., & Senatore, F. (2016). Chemical composition of the essential oil of *Centaurea grinensis* Reuter and *Centaurea apiculata* Ledeb: Growing wild in Croatia and Bulgaria, respectively and PCA analysis of subgenus *Lopholoma* (Cass.) Dobroc. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, 3504(November), 1–10.
- Riccobono, L., Maggio, A., Rosselli, S., Ilardi, V., Senatore, F., & Bruno, M. (2016). Chemical composition of volatile and fixed oils from *Salvia argentea* L. (Lamiaceae) growing wild in Sicily. *Natural Product Research*, 30(1), 25–34.
- Rodríguez Albornoz, M. C. (2013). ESTUDIO DE LA CHIRIMOYA Y PROPUESTA DE

REPOSTERÍA DE AUTOR. *UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DEL ECUADOR ESCUELA DE GASTRONOMÍA*, 23–218.

Rodríguez Flores, O. R., Torrez Centeno, E. A., & Valenzuela Betanco, R. A. (2005). Plantas utilizadas para el tratamiento de enfermedades en los animales domésticos, Reserva Natural El Tisey, Estelí. *Tesis*, 53–54.

Ruiz, S., Malagón, O., Zaragoza, T., & Valarezo, E. (2010). Composition of the Essential Oils of *Artemisia sodiroi* Hieron., *Siparuna eggessii* Hieron., *Tagetes filifolia* Lag. and *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze from Loja Ecuador. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(March 2015), 676–691.

Saikia, A. K., Chetia, D., D'Arrigo, M., Smeriglio, A., Strano, T., & Ruberto, G. (2013). Screening of fruit and leaf essential oils of *Litsea cubeba* Pers. from north-east India – chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Essential Oil Research*, 25(4), 330–338.

Santos, A. C. A. dos, Rossato, M., Agostini, F., Serafini, L. A., Santos, P. L. dos, Molon, R., ... Moyna, P. (2009). Chemical Composition of the Essential Oils from Leaves and Fruits of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi from Southern Brazil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12(1), 16–25.

Scheldeman, X. (2002). Distribution and potential of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) and highland papayas (*Vasconcellea* spp.) in Ecuador. *Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences Department Plant Production*, 47–190.

Sena. (2011). Introducción a la industria de Los aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas, 1–33.

Smigielski, K., Raj, A., Krosowiak, K., & Gruska, R. (2009). Chemical composition of the essential oil of *Lavandula angustifolia* cultivated in Poland. *J. Essent. Oil Bearing Plants*, 12(3), 338–347.

Stashenko, E. E. (2009). Aceites Esenciales. In *División de Publicaciones UIS* (p. 180).

Vanhove, W. (2008). *Chirimoyo (Annona Cherimola Mill)*. Roma, Italia.

Vargas Corrales, V. (2010). Elaboración de té aromático a base de plantas cedrón (*aloesiacitrodora*) y toronjil (*mellisaofficinalis*) procesado con stevia (*steviarebaudiana bertonii*) endulzante natural, utilizando el método de deshidratación. *UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI UNIDAD ACADEMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES*, 19–123.

Vega, E. M. (2013). Revisión bibliográfica Chirimoya (*Annona cherimola* Miller), frutal tropical y sub-tropical de valores promisorios. *Cultivos Tropicales*, 34(3), 52–63.

Vildózola, Á. C. (2002). Guía técnica para la producción de chirimoya. *INSTITUTO DE*

INVESTIGACIÓN Y CAPACITACION AGROPECUARIA, ACUÍCOLA Y FLORESTAL DEL ESTADO DE MÉXICO, 6–27.

- Vit, P., & Santiago, B. (2014). Composición química y actividad antioxidante de pulpa , hoja y semilla de guanábana *Annona muricata* L . *Interciencia*, 39(5), 350–353.
- Xavier, V. B., Minteguiaga, M., Umpiérrez, N., Vargas, R. M. F., Dellacassa, E., & Cassel, E. (2016). Olfactometry evaluation and antimicrobial analysis of essential oils from *Baccharis dentata* (Vell.) G.M. Barroso and *Baccharis uncinella* DC. *Journal of Essential Oil Research*, 2905(July).
- Yagües Gomis, V. (2008). Cromatografía de gases. *Cromatografía*, 0–19.
- Zaraza Moncayo, M. (2012). Actividad antibacteriana del aceite esencial de la *Conoclea scoparioides* frente a cinco cepas bacterianas de interes clínico en COLOMBIA., 1–65.
- Zekaria, D. (2007). Los aceites esenciales, una alternativa a los antimicrobianos. *Laboratorios Calier*, 1–6.

ANEXOS

ANEXO I DETERMINACIÓN DE HUMEDAD RELATIVA

PRINCIPIO:

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

MATERIAL:

- Lámpara
- Pinza
- Balanza
- Crisol
- Desecador

PROCEDIMIENTO:

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

CÁLCULO:

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

Dónde:

Hm: %de humedad

m: peso de la cápsula vacía (gr)

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

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

ANEXO II

DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO

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

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

Dónde:

R: % de Rendimiento.

V: Volumen del aceite esencial extraído en mL.

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

ANEXO III
DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA A 20°C
(Método de Referencia)

Según la AFNOR NF T 75-111 JUNIO 1982

PROPUESTA:

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

OBJETIVO DE APLICACIÓN:

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

REFERENCIAS:

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

PRINCIPIO:

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

NOTA:

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

APARATOS:

- Picnómetro de vidrio.
- Baño termostático, mantenido a una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$.
- Termómetro de precisión graduado de 10 a 30°C , con una variación de 0.2°C a 0.1°C .
- Balanza analítica.

PROCEDIMIENTO:

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

EXPRESIÓN DE RESULTADOS:

La densidad relativa d_{20}^{20} se la expresa con la fórmula (5)

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

Dónde:

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

m_0 : masa en gramos del picnómetro vacío.

m_1 : masa en gramos del picnómetro con agua.

m_2 : masa en gramos del picnómetro con aceite esencial.

Se expresarán los resultados con tres decimales.

ANEXO IV

DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN (Método de Referencia)

Según la AFNOR NF T 75-112 /1988

PRINCIPIO:

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

DEFINICIÓN:

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

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

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

APARATOS:

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

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

1.3330 para agua destilada.

1.4906 para el p-cimeno.

1.5685 para el benzoato de bencilo.

1.6585 para el 1-bromo naftaleno.

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

MODO DE OPERACIÓN:

Determinación

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

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

Resultados:

Cálculos. El índice de refracción a la temperatura de referencia está dado por la fórmula (6).

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

Dónde:

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

F = factor de corrección (0.0004)

t' = temperatura a la que se efectuó la lectura

t = temperatura a 20°C

Nota: Expresar los resultados con cuatro cifras decimales. La precisión de la determinación es de ±0.0002

ANEXO V

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ÓPTICA

PRINCIPIO:

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

DEFINICIONES:

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

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

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

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

REACTIVOS:

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

SOLVENTE:

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

APARATOS:

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

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

La fuente de luz: Comprende un dispositivo a una longitud de onda de 589.3nm ± 0.5nm con una lámpara de vapor de sodio.

Tubos polarimétricos: Usualmente de 100mm ± 0.5mm de longitud. Para muestras ligeramente coloreadas o de baja rotación óptica se deben usar tubos de más o menos 200mm ± 0.5mm, tubos de 50mm ± 0.05mm o 10mm ± 0.05mm 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°C ± 0.2°C o especificar la temperatura, para la muestra que va en el tubo polarimétrico apropiado. Mantener el agua que está circulando con un control termostático, mantener la temperatura especificada durante la determinación. Llenar el tubo con la muestra y asegurarse de la ausencia de burbujas. Coloque el tubo en el polarímetro y lea la dextro rotación (+) o la levo rotación (-) del aceite que en la escala muestra el instrumento.

RESULTADOS:

Cálculos y fórmulas

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

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

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

I = es la longitud del tubo usado en mm.

Marque como (+) la rotación hacia la derecha en el sentido de las manecillas del reloj y como (-), en el sentido contrario a las manecillas del reloj. Cuando por los tubos de pared gruesa la circulación de agua no es correcta, es necesario aplicar factores de corrección apropiados o

de acuerdo al aceite ensayado (para aceites esenciales de cítricos y para otros se conocen factores de corrección específicos).

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

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

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

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

Dónde:

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

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

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

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

Dónde:

α = Actividad óptica calculada

αl = Actividad óptica leída

l = Dimensión del tubo (dm)=1

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

c = Concentración muestra (gr/ml)

