



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

TEMA:

Determinación de la composición química, propiedades físicas y actividad biológica del aceite esencial de *Gnaphalium elegans* (Asteraceae) de la Provincia de Loja

AUTORA:

María del Carmen Guamán López

DIRECTOR:

Ing. Benito Eduardo Valarezo Valdez

**Trabajo de Fin de Carrera
previa a la obtención de
Bioquímico Farmacéutico**

LOJA-ECUADOR 2012

CÉSION DE DERECHOS DE TESIS

Yo María del Carmen Guamán López declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 de Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente dice: forman parte del Patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y de tesis de grado que se realizan a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad.

Loja, Marzo del 2012

f).....

María del Carmen Guamán López

CERTIFICACIÓN

Loja, Marzo del 2012

Ing. Eduardo Valarezo
DOCENTE INVESTIGADOR DE LA UTPL
DIRECTOR DE LA TESIS

CERTIFICO:

Que el presente trabajo de investigación titulado: "Determinación de la composición química, propiedades físicas y actividad biológica del aceite esencial de *Gnaphalium elegans* (Asteraceae) de la Provincia de Loja" cumple con los requisitos que exige el reglamento de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en aspectos de forma y contenido, por lo cual permito autorizar su presentación para los fines pertinentes.

f).....

Ing. Eduardo Valarezo
DIRECTOR DE TESIS

AUTORÍA

Los conceptos, la presentación, y los procedimientos, así como, los resultados y conclusiones vertidos en el presente trabajo de tesis son de responsabilidad absoluta de su autora.

f).....

María del Carmen Guamán López

AGRADECIMIENTO

Primeramente a Dios, por darme la existencia, ser mi luz, mi guía y por haberme permitido llegar a la culminación de mi carrera.

Retribuyo la confianza, el esfuerzo y el apoyo de mis padres y hermanos, para llevar a cabo la culminación de la carrera.

Mi sincero agradecimiento al Ing. Eduardo Valarezo Director de Tesis por ser el impulsor para el desarrollo, finalización de la presente investigación le estaré muy agradecida por su generosidad, por su asesoramiento y dirección en el trabajo.

Así mismo agradecer a la Ing. Diana Guaya, Vladimir Morocho quienes supieron brindarme sus conocimientos, su apoyo para el desarrollo de la presente investigación.

Al personal que labora en el Instituto de química Aplicada, por facilitar sus instalaciones para el desarrollo de la investigación.

Finalmente a mis compañeras de trabajo, quiénes día a día supieron apoyarme, me brindaron su cariño, comprensión y porque la constante comunicación contribuyeron en gran medida a transformar y mejorar mi forma de actuar y culminar con la presente investigación.

María del Carmen

DEDICATORIA

La presente investigación dedico primeramente a Dios quién me dio la fuerza, fortaleza, mi guía para la culminación de la investigación y llegar a cumplir uno de mis grandes sueños como es de Bioquímica Farmacéutica.

A mis padres, quienes han sabido formarme día a día con buenos sentimientos, hábitos y supieron aconsejarme para que vaya por el buen camino.

A mis hermanos Diego, Soraya y Andrea que me supieron brindar su apoyo para la finalización de la misma.

A mis mejores amigas, Diana, Anabel, Alejandra, Mónica que durante el transcurso de la carrera no duraron en brindarme su amistad, sus consejos para la culminación de la carrera.

María del Carmen

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CESIÓN DE DERECHOS	I
CERTIFICACIÓN	II
AUTORÍA	III
AGRADECIMIENTO	IV
DEDICATORIA	V
ÍNDICE	VI
I. FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO	
1.1. Fin del proyecto	02
1.2. Propósito del proyecto	02
1.3. Componentes del proyecto	02
II. INTRODUCCIÓN, JUSTIFICACIÓN Y ANTECEDENTES.	
2.1. Introducción	04
2.3. Antecedentes	07
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. Identificación de la materia vegetal	12
3.2. Recolección y selección de la materia vegetal.	12
3.2.1. Recolección de la materia vegetal	12
3.2.2. Selección de la materia vegetal	13
3.3. Destilación de la materia vegetal	14
3.3.1. Envasado y Almacenamiento	15
3.4. Determinación de la humedad y rendimiento de la materia vegetal	16
3.4.1. Humedad	16
3.4.2. Rendimiento	16
3.5. Determinación de Propiedades físicas del aceite esencial	17
3.5.1. Densidad relativa	17
3.5.2. Índice de Refracción	17
3.6. Determinación de la composición química del aceite esencial	18
3.6.1. Preparación de las muestras	21
3.6.2. Corrida cromatográfica de las muestras por CG-MS en la columna capilar DB-5MS	21

3.6.3.	Corrida cromatográfica de las muestras por CG-MS en la columna capilar HP-INNOWAX	22
3.6.4.	Obtención de los cromatogramas	24
3.6.5.	Determinación de los Índices de Kóvats	24
3.6.5.1.	Identificación de los compuestos en CG-EM en las columnas capilares DB-5MS y HP-INNOWAX	24
3.6.6.	Corrida cromatográfica de las muestras por CG-FID en la columna capilar DB-5MS	27
3.6.7.	Corrida cromatográfica de las muestras por CG-FID en la columna capilar HP-INNOWAX	28
3.6.8.	Identificación de los compuestos en CG-FID en las columnas capilares DB-5MS y HP-INNOWAX.	29
3.7.	Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica	30
3.7.1.	Pruebas antimicrobianas	30
3.7.2.	Preparación del aceite esencial de la <i>Gnaphalium elegans</i>	30
3.7.3.	Microorganismos en prueba	31
3.7.4.	Microdilución en caldo (Concentración Mínima Inhibitoria)	31
3.7.4.1.	Preparación del cultivo Overnight (Bacterias)	31
3.7.4.2.	CMI antibacterianos	32
3.7.4.3.	CMI antifúngicos	32
IV.	ANÁLISIS Y RESULTADOS	
4.1.	Estado fenológico de la materia vegetal	34
4.2.	Determinación de la Humedad	34
4.3.	Determinación del rendimiento	35
4.4.	Propiedades Físicas del aceite esencial	36
4.5.	Composición Química del Aceite esencial de GE	37
4.6.	Espectros de Masas	44
4.6.1.	Datos espectrales de los compuestos mayoritarios del aceite esencial <i>Gnaphalium elegans</i>	44
4.7.	Actividad antibacteriana y antifúngica	48
4.7.1.	Concentración mínima Inhibitoria (CMI) para bacterias	48
4.7.2.	Concentración mínima Inhibitoria (CMI) para hongos	48

V.	CONCLUSIONES	51
VI.	RECOMENDACIONES	54
VII.	ANEXOS	59

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO	PÁG.
GRÁFICO 01: Área de estudio de la materia vegetal <i>Gnaphalium elegans</i> en Saraguro Provincia de Loja	13
GRÁFICO 02: Fecha y cantidad de materia vegetal en las tres recolecciones	13
GRÁFICO 03: Esquema de destilación de la especie vegetal	15
GRÁFICO 04: Esquema de las corridas cromatográficas	20
GRÁFICO 05: Parámetros operacionales del CG-EM en la columna DB-5MS	22
GRÁFICO 06: Parámetros operacionales del CG-EM en la columna HP-INNOWAX	23
GRAFICO 07: Cromatograma del aceite esencial <i>G.elegans</i> muestra 131 en DB-5MS	24
GRÁFICO 08: Datos espectrales del compuesto alfa selinene	25
GRÁFICO 09: Parámetros operacionales para a columna capilar DB-5MS para CG-FID	28
GRÁFICO 10: Parámetros operacionales para la columna capilar HP-INNOWAX para CG-FID	29
GRÁFICO 11: Compuestos mayoritarios del aceite esencial de la materia vegetal <i>Gnaphalium elegans</i> en las dos columnas DB-5MS y HP- INNOWAX	40
GRÁFICO 12: Cromatograma de la materia vegetal <i>Gnaphalium elegans</i> . a. Columna DB-5MS (muestra 121) en CG-EM y b. Columna HP- INNOWAX (muestra 121) en CG-EM.	43
GRÁFICO 13: Datos espectrales de los compuestos mayoritarios. a. γ -curcumene b. δ -cadinene c. β -caryophyllene d. α -pinene e. Italicene	44

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	PÁG.
TABLA 1: Estado fenológico de la materia vegetal	34
TABLA 2: Humedad promedio de las muestras	35
TABLA 3: Rendimiento promedio de las muestras	35
TABLA 4: Densidad relativa de la mezcla de los tres aceites de cada recolección	36
TABLA 5: Índice de refracción media del aceite esencial	37
TABLA 6: Composición química del aceite esencial de <i>Gnaphalium elegans</i>	38
TABLA 7: Porcentaje relativo de los componentes del aceite esencial de <i>Gnaphalium elegans</i> para CG-MS y CG-FID en la columna DB-5MS y HP-INNOWAX	41

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA	PÁG.
FOTOGRAFIA 01: Muestra de herbario <i>Gnaphalium elegans</i>	09
FOTOGRAFÍA 02: Preselección de la materia vegetal	14
FOTOGRAFÍA 03: Envasado del A.E.	16
FOTOGRAFÍA 04: Almacenamiento del A.E	16
FOTOGRAFÍA 05: Peso del picnómetro con el aceite esencial	17
FOTOGRAFÍA 06: Refractómetro	18
FOTOGRAFÍA 07: Cromatógrafo de Gases	19
FOTOGRAFÍA 08: Viales conteniendo aceites con diclorometano.	21
FOTOGRAFÍA 09: Medios de cultivo	30
FOTOGRAFÍA 10: Siembra de bacterias	31

RESUMEN

Se determinó la composición química, propiedades físicas y actividad biológica del aceite esencial *Gnaphalium elegans*.

La humedad promedio fue de 69,3% y su rendimiento de 0,11%, con respecto a las propiedades físicas del AE la densidad promedio fue de 0,9303 g/cm³ y el índice de refracción de 1,4959.

Se identificaron 25 compuestos en total del aceite esencial correspondiendo el 89,40% y el 88,59% para DB-5MS y HP-INNOWAX respectivamente. Los componentes mayoritarios son: γ -curcumene (41,48%); δ -cadinene (6,80%); β -caryophyllene (5,37%); α -pinene (3,50%); Italicene (3,62%).

En cuanto a la actividad biológica se determinó mediante el método de microdilución en caldo. El aceite esencial de *Gnaphalium elegans* fue inactivo frente a las bacterias gram-negativas *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 9997); *Proteus vulgaris* (ATCC 8427); *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2), y las bacterias gram-positivas *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) sin embargo frente a los hongos *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185) y *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) inhibió en una concentración de 1000 ug/mL y 500 ug/mL respectivamente.



DETERMINATION OF THE CHEMICAL COMPOSITION, PHYSICAL AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF *Gnaphalium elegans* (ASTERACEAE) FROM PROVINCE OF LOJA

María del Carmen Guamán¹, *Eduardo Valarezo², Vladimir Morocho²

Email: mdguaman@utpl.edu.ec

¹ Escuela de Bioquímica y Farmacia, Universidad Técnica Particular de Loja

² Instituto de Química Aplicada, Universidad Técnica Particular de Loja, San Cayetano Alto, Loja, Ecuador.

Email: bevalarezo@utpl.edu.ec

ABSTRACT

In the essential oil from aerial parts of *Gnaphalium elegans*, extracted by hydrodistillation and analyzed by Gas Chromatography coupled to mass spectroscopy (GC-MS) and Gas Chromatography flame ionization detector (GC-FID) techniques, were identified twenty-five components the main compounds were: γ -curcumene (39,27%); δ -cadinene (8,52%); β -caryophyllene (4,84%), α -pinene (3,39%), Italicene (3,17%). The antimicrobial activity and antifungal activity of this oil was assayed against with a minimal inhibitory concentration (MIC): against two Gram Positives: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and five Gram Negatives: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 9997, *Proteus vulgaris* ATCC 8427, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella Tiphymurium* LT2; the fungi: *Tricophyton mentagrophytes* ATCC 2885, *Tricophyton rubrum* ATCC 28188 and *Aspergillus niger* ATCC 9642-U. The results were: the essential oil was inactive in all bacteria, in the fungi was able to inhibit in *Tricophyton mentagrophytes* and *Tricophyton rubrum* inhibited of 500 μ g/mL and 1000 μ g/mL, and against *Aspergillus niger* was inactive. This is the first report on the chemical composition and biological activity of this specie.

Key Words Index

Asteraceae, *Gnaphalium*, Essential oils, Biological activity

INTRODUCTION

Ecuador has many native and endemic plants, the essential oil is considered a industrial product[1]. The family Asteraceae is the largest group of vascular plants in terms of number of species[2], within the same gender is *Gnaphalium* which are a type of annual or perennial herbs[3]. The *Gnaphalium elegans* of a type of herbs native to the Andes and medicinal leaves to help to cure ulcerated wounds[4].

The essential oils have significant in the antimicrobial activity, such as antifungal, antibacterial and antioxidant, making removal emerges as a viable

production alternative to the use of plants [5]. This is the first report on the chemical composition and biological activity of this specie.

EXPERIMENTAL

Plant material collection and essential oil extraction

The aerial parts of the *Gnaphalium elegans* were used. The plants were collected at ambient conditions in Loma la Torre Saraguro (Loja, Ecuador). Bolívar Merino (Herbarium of the Universidad Nacional de Loja, Ecuador) realized the taxonomic identification of plant material, the plant



samples were preserved in the herbarium of UTPL.

Extraction of essential oil

The essential oil by hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus. Approximately 2600g. of fresh total plant material were used in each distillation for two hours. The essential oil of the three collected samples were labeled and stored at 4°C until being analyzed.

Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS)

The qualitative analysis of essential oils was performed in an Agilent gas chromatograph (model 6890N) coupled to a mass spectrometry detector (MS) (model 5973 inert series). Two capillary columns were used. Firstly, an apolar DB-5MS 5%-phenyl-methylpolysiloxane 30 m x 0.25 mm, thickness 0.25 µm film (Agilent 122-5532) and secondly a polar HP-INNOWAX polyethyleneglycol 30 m x 0.25 mm, thickness 0.25 µm (Agilent 19091N-133).

The MS detector was operated at 250 °C, using helium carrier gas. Essential oils were diluted in CH₂Cl₂ before injection (50:1). Retention index of the compounds were determined based on retention time of the standard (hydrocarbons C10-C25), injected under the same conditions.

Gas Chromatography (GC/FID)

The quantitative analysis of the essential oils was performed using a flame ionization detector (FID). The FID detector was operated at 250 °C, Gas Generator 9150 PACKARD.

Physical properties of essential oils

Physical properties, relative density and index refraction of the essential oils were determined.

Relative density was determined according to the standard ANFOR NF T75-11 requirements, using a pycnometer (1mL) and an analytical balance at 20°C.

Refraction index was determined according to the standard ANFORNF T75-112 using a refractometer (model ABBE) at 20°C.

All measurements were performed three times.

BIOLOGICAL ACTIVITY

Antibacterial activity

We determined the minimum inhibitory concentration (MIC) against 7 strains of bacterium: 2 Gram Positive: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and 5 Gram Negative: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 9997, *Proteus vulgaris* ATCC 8427, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella Tiphymurium* LT2, subjecting the essential oil to each of the above microorganisms, using the dilution. Sterile 96-well plates, underwent essential oil each of the test organisms incubated for 24 h at 37 °C, the bacterial population was adjusted 3x10⁶ufc/mL with Muller-Hinton broth to be placed in each well 100 at the end of the test except in the control of sterility, the amount being adjusted 5x10⁵ufc/mL in a total volume of 200 µl.

It were used three controls: Sterility, DMSO, gentamicin and ampicillin (antibiotics), performing the same procedure were incubated for 24h at 37 °C.

The test was performed in triplicate.

Antifungal activity

Trichophyton mentagrophytes ATCC 2885, ATCC 28188 *Trichophyton*



rubrum and *Aspergillus niger* ATCC 9642.

For this evaluation used the same solution used in WCC work with bacteria (20µl mL/DMSO); follow the same procedure as mentioned above is that of a serial dilution varying only certain parameters: the final concentration of inoculum 5×10^4 fungy/ mL, final concentration of essential oil of 1000 to 0.05 mg/mL in serial dilutions is made up obtain nine consecutive dilutions and positive control that uses a 1mg/mL solution of itraconazole. Plates were incubated at 28 ° C for 24-96h. Testing with each fungus was performed in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

Table1. Humidity of fresh plant, yield and physical properties of essential oil the *Gnaphalium elegans*

C*	Hm (%)	R (%)	d ²⁰	n ²⁰
1	64	0,10	0,922	1,4932
2	71	0,12	0,932	1,5021
3	73	0,13	0,936	1,4925

C*=collections

Hm=relative humidity

R= yield of essential oil

d²⁰= relative density of the essential oil

n²⁰=index of refraction of the essential oil

The essential oil extracted from aerial parts of *Gnaphalium elegans* at the phonological stage of flowering was yellow liquid in appearance.

The mean of the density of the three collections of essential oil was 0.9303 g/cm³ and the refraction index is 0,4959.

The results of the qualitative and quantitative analysis Table 2 in order of elution from the DB5-MS column. From essential oil of *Gnaphalium elegans* 25 compounds were identified, representing 89.85% for DB-5 column and 88.59% for HP-INNOWAX (Table 2),using Kovats index and mass spectra the main compounds were: γ-curcumene (41,48%); δ-cadinene (6,80%); β-caryophyllene (5,37%), α-pinene (3,50 %), Italicene (3,62%) belong to the group of sesquiterpenes.

So far it has not been possible to find studies on the chemical composition of essential oil of this species.



TABLE 2: Chemical composition of essential oil of *Gnaphalium elegans*

N°	Compound ^a	DB-5MS					HP-INNOWAX ^b					
		INDEX KOVATS		%RELATIVE AMOUNT ^e			INDEX KOVATS		% RELATIVE AMOUNT ^e			
		K ^c	K ^d	\bar{x}	σ	CV	K ^c	K ^d	\bar{x}	σ	CV	
1	α - pinene	942	938 ^f	3,14	0,01	0,0280	1018	1007 ^p	3,63	0,01	0,0028	
2	α - cubebene	1368	1345 ^f	1,27	0,01	0,0140	1478	1463 ^g	0,87	0,01	0,0115	
3	α -copaene	1361	1376	9,11	0,06	0,0066						
4	Italicene	1396	1406 ^f	3,61	0,02	0,0055	1527	1543 ^h	2,74	0,03	0,0115	
5	α -cedrene	1406	1409 ⁱ	1,4	0,01	0,0071	1548	1578 ⁱ	0,4	0,01	0,0109	
6	β -caryophyllene	1411	1418 ^f	4,53	0,01	0,0022	1581	1618 ^g	5,15	0,01	0,0250	
7	α -trans-bergamotene	1436	1434 ^g	1	0,02	0,0200						
8	Z- β -farnesene	1449	1443 ^g	0,65	0,01	0,0154						
9	Aromadendrene	1428	1441 ^f	0,87	0,03	0,0345	1590	1600 ^j	2,87	0,01	0,0019	
10	γ -muurolene	1467	1477 ^f	1,98	0,05	0,0253	1674	1684 ^g	3,17	0,04	0,0035	
11	α -muurolene	1490	1480 ^f	1,14	0,02	0,0175	1712	1727 ^g	1,21	0,01	0,0126	
12	γ - curcumene	1476	1482 ^f	45,89	0,24	0,0052	1690	1680 ^h	32,64	0,22	0,0083	
13	β -selinene	1480	1485 ^f	0,93	0,03	0,0323	1703	1711 ^k	1,34	0,04	0,0067	
14	α -selinene	1488	1494 ^h	1,47	0,05	0,0340	1709	1724 ^g	1,32	0,02	0,0299	
15	α -bisabolene	1495	1507 ^f	0,58	0,01	0,0172						
16	γ -cadinene	1504	1513 ^g	7	0,07	0,0100						
17	δ -cadinene	1511	1524 ^h	3,92	0,01	0,0026	1745	1749 ^g	13,13	0,04	0,0030	
18	α -cadinene	1527	1538 ^g	0,21	0,01	0,0476						
19	α -Bisabolol	1680	1683 ^g	1,15	0,03	0,0261	2213	2153 ^l	1,25	0,02	0,0160	
20	α -gurjunene						1514	1529 ^g	1,43	0,01	0,0070	
21	β -cubebene						1575	1558 ^m	0,61	0,01	0,0164	
22	β -gurjunene						1589	1593 ⁿ	0,65	0,01	0,0154	
23	β -bisabolene						1718	1726 ^o	1,9	0,02	0,0105	
24	α -curcumene						1769	1777 ⁿ	13,13	0,03	0,0023	
25	β -bisabolol						2145	2106 ^k	2,78	0,05	0,0180	
		*Total		89,85				*Total		88.59		

CV= Coefficient of variation

GE: *Gnaphalium elegans*

KI=Kovats Index

a= Compounds ordered according to the elution order in the column DB-5MS

b= Compounds ordered according to the elution order in the column HP-INNOWAX

c= Kovats index identified in the column only DB-5MS y HP-INNOWAX

e= Average percentages of relative percentage of the compounds identified in both columns

d= Kovats Index in the column only DB-5MS y HP-INNOWAX

\bar{x} =Average total area of chemical compounds for each collection

σ =estandar deviation

*=Sum of compounds identified in both columns

IK Ref., referencias: ref^f, ref^g, ref^h, refⁱ, ref^j, ref^k, ref^l, ref^m, refⁿ, ref^o, ref^p.



Table 3. Minimal inhibitory concentration for the evaluated fungi

Minimal Inhibitory concentration ($\mu\text{g/mL}$)			
Microorganism			
Oils	Tm	Tr	An
GE 111	1000	500	NA
GE 112	1000	500	NA
GE 113	1000	500	NA
GE 121	1000	500	NA
GE 122	1000	500	NA
GE 123	1000	500	NA
GE 131	500	1000	NA
GE 132	500	1000	NA
GE 133	500	1000	NA

Itraconazole: positive controls 100% inhibition (7,81 $\mu\text{g/mL}$)

Tm: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 28185,

Tr: *Trichophyton rubrum* ATCC 28188

An: *Aspergillus niger* ATCC 9642-U.

NA: not active

The essential oil was inactive in Gram-positive bacterium and Gram-negative bacterium.

The obtained results of the antifungal CMI are shown on the table 3.

The MIC values for fungi evaluated in the three collections made, that of *T. mentagrophytes*, nine oils inhibited at a concentration of 1000 $\mu\text{g/mL}$ and 500 $\mu\text{g/mL}$. The MIC for the fungi *T. rubrum* essential oils inhibit in a concentration of 500 $\mu\text{g/mL}$ and 1000 $\mu\text{g/mL}$. and *Aspergillus niger* was inactive.

ACKNOWLEDGEMENTS

The Institute of Applied Chemistry at the UTPL for lending facilities for the development of it,

REFERENCES

1. Chuiliza J., y Ulloa P., Proyecto de extracción de aceite esencial de Jenjibre como alternativa de exportación” (Tesis, ICHE, Escuela Superior Politécnica del Litoral, 2005.
2. Dematteis M., Las Compuestas (Asteraceae) del Parque Nacional Mburucuyá, Universidad Nacional de Nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas; Resumen: B-043, 2005
3. Missouri Botanical Garden in: <http://mobot.mobot.org/W3T/Search/vast.html>.
4. De la Torre L., Muriel P., Macía M., Balseu H., Enciclopedia de las Plantas útiles del Ecuador. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de Universidad de Aarhus. Quito & Aarhus, 2008.
5. Arango O., Hurtado A., Castillo P., Santacruz M. Estudio de las condiciones por arrastre con vapor del aceite esencial de laurel de cera (*Morella pubescens*), Facultad de Ciencias Agropecuarias, 2009.
6. Cereda R., Sader H., Sejas., Machado A., Zanatta Y., Rego S., Medeiros E., Enterococcus faecalis resistant to vancomycin and teicoplanin (VanA phenotype isolated from a bone marrow transplanted patient in Brazil, The Brazilian Journal of infectious Diseases 5: 40-6, 2001.
7. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz., 97:1027–312002.

CAPÍTULO I

FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO



I. FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1.1. FIN DEL PROYECTO

Contribuir al estudio de aceites esenciales provenientes de especies vegetales de la flora aromática de la región Sur del Ecuador.

1.2. PROPÓSITO DEL PROYECTO

Caracterizar las propiedades físico-químicas del aceite esencial de la especie *Gnaphalium elegans* (Asteracea) y evaluar su actividad antibacteriana y antifúngica.

1.3. COMPONENTES DEL PROYECTO

1. Obtención del aceite esencial de la especie vegetal utilizando el método de arrastre por vapor de agua.
2. Determinar porcentaje de humedad y rendimiento del aceite esencial de la especie vegetal que se estudia.
3. Determinar las propiedades físicas: densidad e índice de refracción
4. Identificar los componentes químicos del aceite esencial de la especie vegetal *Gnaphalium elegans*, mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-MS) y al Detector de Ionización en Llama (CG-FID).
5. Evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica del aceite esencial.

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN Y **ANTECEDENTES**



II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1. INTRODUCCIÓN

Las plantas aromáticas cuyos principios activos están constituidos, total o parcialmente, por esencias, representan alrededor de un 0,7 por 100 del total de las plantas medicinales¹. El uso de las plantas aromáticas y medicinales tiene un origen muy antiguo, la necesidad de estas hierbas era satisfecha por la recolección directa de las poblaciones espontáneas o silvestres².

Muchas de las plantas con aroma tienen algún principio medicinal pero también existen plantas con actividad terapéutica que no tienen aroma. Entonces una planta es considerada medicinal si contiene en toda o en alguna de sus partes sustancias llamadas principios activos, que ejercen una acción terapéutica en el organismo. Representan el 14,5% de las especies conocidas y dentro de éstas sólo el 0,66% son aromáticas, es decir, que contienen aceites esenciales o componentes volátiles³.

En las últimas dos décadas ha crecido notablemente el interés por los productos naturales obtenidos de especies vegetales como: aceites esenciales y oleorresinas, por parte de las industrias cosméticas, farmacológicas y en especial de alimentos, ya que además de su aporte como aromáticos existen numerosos trabajos que avalan su actividad biocida, antioxidante y en muchos casos podrían tener un potencial efecto benéfico para la salud³.

Las principales propiedades de las especies aromáticas se deben a la presencia de aceites esenciales en diferentes partes de la planta⁴. Las plantas aromáticas son las que concentran una mayor cantidad de esencias y por tanto constituyen la materia prima para su obtención, bien sea empleando toda la planta, sólo sus hojas, flores, frutos o raíces, dependiendo de la planta concreta de que se trate⁵. Debido a sus numerosas propiedades, la utilización de las plantas aromáticas y medicinales y la de sus principios activos, proporcionan importantes beneficios medioambientales, económicos y sociales, además de constituir un amplio campo de aplicación de las industrias alimentaria, farmacéutica, y perfumero-cosmética¹.

¹Palacio G. L., Las plantas medicinales y aromáticas una alternativa para el futuro, Boletín económico ICE N° 2652, pp.20, 2000.

²Prieto C., Estudio y Recopilación de datos sobre Plantas Aromáticas y Medicinales de la zona de Tierra de campos y Montes de Torozos, Valladolid, pp. 4, 2005.

³Gabucci L., La esencia de las plantas, Énfasis alimentación online, Dpto. de Ciencias Básicas. Universidad Nacional de Luján, Argentina, pp 1,2,3, 2007.

⁴Elechosa A., Juárez Miguel A., Evaluación de la producción Nacional las Plantas Aromáticas y sus Aceites Esenciales, Centro de Recursos Naturales IRB, IC y AINTA Castelar, Buenos Aires, pp. 61, 2001

⁵Ortuño M., Manual Práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Ediciones AIYANA, Primera Edición, 2006.



Las plantas aromáticas se han utilizado como remedio para combatir todo tipo de males; las primeras informaciones sobre estas plantas fueron transmitidas de forma oral por los hechiceros o chamanes a sus aprendices. Luego aparecieron los primeros herbarios que daban cuenta de las plantas recolectadas en aquella época².

Los aceites esenciales o esencias vegetales son mezclas de un número variable de sustancias orgánicas aromáticas, parte del metabolismo de un vegetal, compuesto generalmente por terpenos, que están asociados o no a otros componentes, la mayoría de ellos volátiles, y generan en conjunto el olor de dicho vegetal⁶.

Como parte del metabolismo de una planta, las esencias abarcan una gama muy variada de constituyentes, presentando también en su composición ésteres, alcoholes, aldehídos, cetonas, acetales, fenoles, glucósidos, ceras, hidrocarburos lineales, ácidos grasos, alcaloides, cumarinas, esteroides, y cada vez más una heterogénea variedad de compuestos heterocíclicos, a medida que se avanza en el conocimiento de su composición⁷.

Los aceites esenciales no son compuestos puros sino mezclas de multitud de sustancias (es fácil que un aceite esencial sea una mezcla de más de 100 sustancias químicas distintas) que se encuentran en distintas proporciones y que en conjunto proporcionan al aceite esencial sus características propias⁵.

Los aceites esenciales se pueden extraer del material vegetal, a través de algunos métodos: destilación, lixiviación, enfloración, maceración y expresión. Las variaciones de estos métodos son consideradas algunas veces independientes, pero solo son modificaciones como: condiciones del extracto, combinación de dos de ellos, como extracción con lixiviación, etc. La destilación posee variaciones, entre ellas se tiene el de arrastre por vapor, que consiste en extraer los aceites esenciales mediante vapor de agua, el cual pasa a través del material vegetal arrastrando las partículas de aceite esencial⁸.

²Prieto C., Estudio y Recopilación de datos sobre Plantas Aromáticas y Medicinales de la zona de Tierra de campos y Montes de Torozos, Valladolid, pp. 4, 2005.

⁶Bandoni A., Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica, Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, 1ª ed., Buenos Aires, pp. 27, 2002.

⁷Cruz S., Gómez A, García V, Álvarez L., Cáceres A., Morales J., "et al.", Caracterización de Aceites Esenciales y extractos de ocho especies Mesoamericanas de Piperaceas y evaluación de la actividad biocida para su aprovechamiento como nuevos recursos aromáticos y/o medicinales, Universidad de San Carlos de Guatemala, pp. 10, 2006.

⁸Lima S., Análisis de los rendimientos obtenidos de dos especies de eucalipto trabajados en seco a nivel de laboratorio y a nivel planta piloto en la extracción de su aceite esencial, Universidad de San Carlos de Guatemala, Escuela de Ingeniería Química, Mayo 2005.



Este método de arrastre por vapor ofrece la ventaja que el vapor de agua se introduce en el material vegetal a mayor presión, pudiendo de esta manera, romper con facilidad las micelas donde se encuentra confinado el aceite esencial. Tiene la desventaja de no poder reducir de tamaño las partículas a tamices muy pequeños, ya que el vapor arrastraría el material vegetal contaminando al condensado⁸.

Por otra parte, la utilización de aceites esenciales como sustancias medicinales es una aplicación que actualmente vive un nuevo impulso, al quedar englobada dentro del gran auge que experimentan los productos naturales desde hace algunas décadas en los países más desarrollados⁵.

Dado que los aceites esenciales se encuentran en muy pequeña concentración en la planta, generalmente son difíciles de obtener, por lo que es necesaria una gran cantidad de material vegetal (que hay que cosechar y recolectar) y si a esto añadimos su carácter volátil, frágiles y susceptible a la luz. Pueden ser líquidos, la mayoría incoloros y de carácter volátil, los hay muy viscosos o semisólidos, denominados bálsamos (bálsamo de Perú, bálsamo de Tolú) u oleorresinas como la de pimentón, la paprika o el chicle⁶.

Las plantas producen compuestos con propiedades farmacológicas que pueden ser empleados en el combate de diferentes enfermedades, se ha comprobado que los aceites esenciales poseen características de insecticidas, antibacteriana, antioxidante, antifúngicas y antiviral⁵.

Respecto a la actividad antibacteriana, diferentes autores han mostrado como los aceites esenciales con un elevado contenido de fenoles, son potentes microbicidas o inhibidores, la cual depende de sus composiciones químicas¹⁹.

⁸Lima S., Análisis de los rendimientos obtenidos de dos especies de eucalipto trabajados en seco a nivel de laboratorio y a nivel planta piloto en la extracción de su aceite esencial, Universidad de San Carlos de Guatemala, Escuela de Ingeniería Química, Mayo 2005.

⁵Ortuño M., Manual Práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Ediciones AIYANA, Primera Edición, 2006.

⁶Bandoni A., Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica, Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, 1ª ed., Buenos Aires, pp. 27, 2002.

¹⁹Gómez G., Análisis de la composición química y de la actividad biológica de los aceites esenciales de 2 quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br., en función de las condiciones de extracción y secado de la planta, Universidad Industrial de Santander, escuela de Química, Bucaramanga, pp.61, 2007.



La actividad antimicrobiana se utiliza para evaluar la actividad inhibitoria de una planta o sus derivados, la potencia de un compuesto, la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas de una droga vegetal. Para evaluar la actividad es preciso conocer el modelo microbiano perfectamente y tenerlo controlado en las condiciones de laboratorio, ya sea por procedimientos *in vitro* o *in vivo*. La medición de esta actividad puede hacerse por métodos de difusión y dilución. El método de difusión se usa como un procedimiento cualitativo, semicuantitativo y a veces cuantitativo, el método de dilución se usa para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) que se requiere del agente antimicrobiano para inhibir o matar al microorganismo⁷.

2.2. ANTECEDENTES

El universo de las plantas aromáticas es muchísimo mayor, si se considera su origen biológico y su significación comercial. La variabilidad genética de las plantas es una de sus más valiosas virtudes, al aportar una casi infinita riqueza y ser aprovechadas las mismas por el hombre. A esta variabilidad deben sumarse factores ecológicos, culturales, metodológicos agrícolas e industriales⁷.

El mercado mundial de los aceites esenciales genera una continua renovación a través de la tecnología empleada para obtenerlos. A su vez, incentiva la optimización de los equipos usados diariamente, para aumentar su rentabilidad y eficiencia⁹.

Los aceites esenciales extraídos de las plantas aromáticas son una fuente de ingresos importantes para el desarrollo de los pueblos alejados de las grandes ciudades¹⁰. Actualmente los aceites esenciales alrededor del mundo son utilizados con fines cosméticos, alimenticios (saborizantes, condimentos, etc.) y farmacéuticos¹¹.

⁷Cruz S., Gómez A, García V, Álvarez L., Cáceres A., Morales J., "et al.", Caracterización de Aceites Esenciales y extractos de ocho especies Mesoamericanas de Piperaceas y evaluación de la actividad biocida para su aprovechamiento como nuevos recursos aromáticos y/o medicinales, Universidad de San Carlos de Guatemala, pp. 10, 2006.

⁹Cerpa M., Hidrodestilación de Aceites esenciales modelado y caracterización, Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, pp. 15, Abril del 2007.

¹⁰Meza M., N. González de C. y A. Usubillaga, Composición del aceite esencial de *Origanum majorana* L. extraído por diferentes técnicas y su actividad biológica, Rev. Fac. Agron. (LUZ), 24: 725-738, 2007.

¹¹Mahecha C., Actividad antioxidante y antibacteriana de aceites esenciales extraídos de hojas y frutos de *Siparunasessilifora*, previo a la obtención de Magister en ciencias biológicas, Pontificia Universidad Javeriana, departamento de Química, pp. 18, Bogotá 2010.



Los aceites esenciales son usados como agentes carminativos, estimulantes, diuréticos y antirreumáticos; algunos poseen propiedades insecticidas, antifúngicas y antibacterianas frente a microorganismos patógenos y han sido considerados como ingredientes activos en algunos plaguicidas botánicos debido a su eficacia frente a un número considerable de plagas, su toxicidad mínima en mamíferos y su disponibilidad general¹².

En Ecuador, así como en otros países, se observa una creciente disposición hacia el uso de productos naturales; sean estos para alimentación, para uso personal o hasta para decoración, muestra de ello existen varias empresas dedicadas a la extracción de aceites esenciales, algunas de ellas son fundaciones que intentan desarrollar poblaciones indígenas en la Amazonía y otras son netamente empresas con fines de lucro¹³.

Las Asteraceas incluyen gran cantidad de especies útiles (medicinales, agrícolas, industriales, etc.). Algunas han sido domesticadas y cultivadas desde la Antigüedad, su uso etnobotánico ha ayudado a sustentar numerosos pueblos, hoy unos 40 géneros de Asteraceas son relevantes en alimentación humana y animal, fuentes de aceites fijos y aceites esenciales. En terapéutica son usados un gran número de metabolitos secundarios sintetizados por Asteraceas¹⁴.

La región Sur del Ecuador cuenta con gran cantidad de plantas nativas y endémicas, es por ello que el Instituto de Química Aplicada ha realizado y tiene la experiencia en hacer investigaciones de aceites esenciales provenientes de especies vegetales de la flora aromática.

¹²Sánchez Y., Pino O., Correa T., Naranjo E., Iglesia A., Estudio Químico y Microbiológico del aceite esencial de *Piperauratum kunth* (Caisimón de anís), *Rev. Protección Veg.* Vol. 24 No. 1: 39-46, 2009.

¹³Silva C., Estudio de Factibilidad para creación de Empresa productora de Aceite Esencial de Maracuyá, proyecto previo a la obtención del título de Ingeniero en Administración de Procesos, Escuela Politécnica Nacional, pp.10, 2007.

¹⁴Vitto L., Del Petenatti, E.M., Asteráceas de importancia económica y ambiental, primera parte sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas Argentina, Multequina, Núm. 18, pp. 87-115, 2009.



Para desarrollar la presente investigación, se planteó caracterizar una especie Asteracea como es la *Gnaphalium elegans* de la Provincia de Loja, de la cual no se ha podido encontrar un estudio sistemático, identificando sus componentes químicos, propiedades físicas como: densidad, índice de refracción y evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica.

Gnaphalium elegans

Fotografía 01: Muestra de herbario *Gnaphalium elegans*



Fuente: Herbario UTPL
Elaboración: La autora

Ordén Jerárgico

Reino: Plantae

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Magnolidae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Gnaphalium*

Epiteto específico: *elegans*

Nombre vernacular: Yunga ishpingullo blanco.

¹⁵De la Torre L., Muriel P., Macía M., Balseu H., Enciclopedia de las Plantas útiles del Ecuador. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de Universidad de Aarhus. Quito & Aarhus, 2008.



Sinónimos

Gnaphalium poeppigianum DC.; *Gnaphalium poeppigianum* var. *Huigrense* Domke;
Gnaphalium schoburgkii Sch. Bip; *Pseudognaphalium elegans* (Kunth) Kartesz¹⁶.

Descripción Botánica

Es un tipo de hierba anual o perenne, hojas alternas, márgenes finamente crenados, ápice ondulado, tallos cuadrangulares presencia de pubescencia ramificada, flores pequeñas de color amarillo¹⁶.

Distribución Geográfica

En Ecuador esta especie se la encuentra en las provincias de Carchi, Imbabura, Chimborazo, Napo, Pichincha, Tungurahua, Loja¹⁶.

Usos

La especie *Gnaphalium elegans* hierba terrestre nativa de los Andes y medicinal, sus hojas amarradas a heridas ulceradas ayudan a secarlos¹⁵.

¹⁶Missouri Botanical Garden in: <http://mobot.mobot.org/W3T/Search/vast.html>.

¹⁵De la Torre L., Muriel P., Macía M., Balseu H., Enciclopedia de las Plantas útiles del Ecuador. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de Universidad de Aarhus. Quito & Aarhus, 2008.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS



III. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología que se utilizó para la realización de la presente investigación se detalla a continuación:

- Identificación de la materia vegetal
- Recolección y selección de la materia vegetal.
- Destilación de la materia vegetal.
- Determinación de la humedad y rendimiento del aceite esencial
- Determinación de propiedades físicas del aceite esencial.
- Determinación de la composición química del aceite esencial.
- Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica

3.1. Identificación de la materia vegetal

Para el desarrollo de la presente investigación, la materia vegetal fue identificada por Bolívar Maza (Herbario de la UNL), la especie vegetal se conserva en el herbario de la U.T.P.L.

3.2. Recolección y selección de la materia vegetal

3.2.1 Recolección de la materia vegetal

La recolección de la materia vegetal *Gnaphalium elegans* como se indica en el gráfico N° 01, fue recolectada a unos 10 minutos antes de llegar al Cantón Saraguro, en un camino que conduce Loma La Torre, a una altitud de 2857 ms.n.m. con las siguientes coordenadas: 17694033 E, 9596265 N.



GRÁFICO 01: Área de estudio de la materia vegetal *Gnaphalium elegans* en el Cantón Saraguro Provincia de Loja



Elaboración: La autora

Como se indica en el gráfico 02 se realizaron tres salidas de campo en un periodo de espera de 15 días, se recolectó entre 2400g a 2600g. aproximadamente, la misma que fue transportada hasta el Instituto de Química Aplicada (I.Q.A.) al área de Aceites Esenciales para su tratamiento post cosecha. Se hicieron tres destilaciones distintas, de cada recolección, obteniendo un total de 9 muestras.

GRÁFICO 02: Fecha y cantidad de material vegetal obtenida en las tres recolecciones

	Fecha	Cantidad de materia vegetal <i>G. elegans</i>
Recolección 1	15-09-2010	2400g.
Recolección 2	06-10-2010	2600g
Recolección 3	22-10-2010	2500g

Elaboración: La autora

3.2.2. Selección de la materia vegetal

Una vez recolectada la muestra, como se indica en la fotografía 02 necesitó de un adecuado tratamiento, se ejecuta una selección de toda la parte aérea (hojas, tallos e inflorescencias), eliminando impurezas, malezas y de otras partes de la planta no



aprovechables, la materia vegetal se corta en pedazos pequeños con el objetivo de lograr una superficie de contacto con el vapor, y con ello obtener un mejor rendimiento de aceite esencial de la materia vegetal en estudio.

Fotografía 02: Preselección de la materia vegetal



Elaboración: La autora

3.3. Destilación de la materia vegetal

Se realizaron varias pruebas de destilación de la especie vegetal tanto en fresco como en seco y se calculó el porcentaje de rendimiento del aceite esencial obtenido comparando los resultados tanto en base húmeda como en seca, es decir, tomando únicamente el peso de la planta sin contar con el peso del agua, por lo que se determinó que en fresco la especie vegetal tiene más alto rendimiento de aceite. La extracción del aceite esencial se llevó a cabo empleando un equipo de destilación tipo Clevenger.

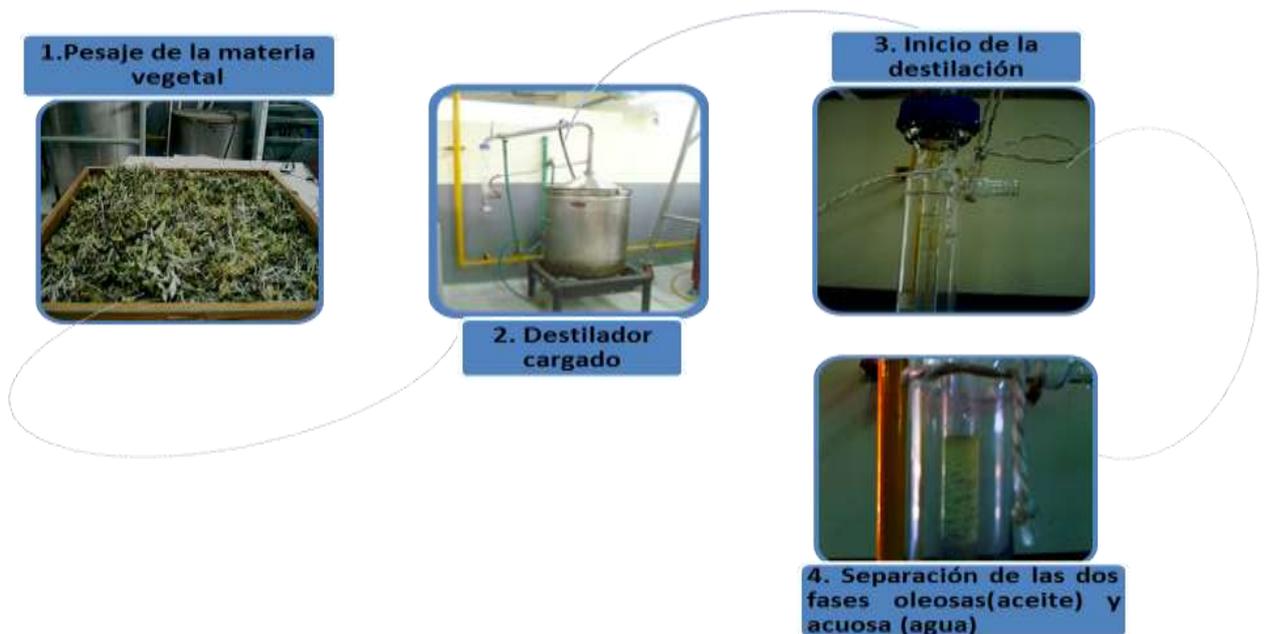
El método para obtener el aceite esencial fue por arrastre de vapor, el cual consiste en una vaporización de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua, el cual ejerce la doble función de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición luego el vapor se condensa y separa las dos fases por decantación. Los vapores que salen del cuello de cisne se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, los dos productos inmiscibles, agua y aceite esencial finalmente se separan por diferencia de densidades en un vaso florentino⁶.

⁶Bandoni A., Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica, Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, 1ª ed., Buenos Aires, pp. 27, 2002.



La materia vegetal fue destilada en base fresca durante 3 horas lapso en el que se obtuvo el aceite esencial. En el gráfico 03 nos indica el proceso para la extracción del aceite esencial.

GRÁFICO 03: Esquema de destilación de la especie vegetal



Elaboración: La Autora

3.3.1. Envasado y Almacenamiento

En las fotografías 03 y 04 el aceite esencial extraído se recogió en probetas, se midió el volumen del aceite y se colocó en un frasco de vidrio color oscuro, este fue etiquetado con una codificación: iniciales de la especie, fecha de destilación y el volumen total obtenido de la destilación, se lo almacenó a refrigeración a -4°C para evitar degradación química por presencia de la luz solar^[9].

⁹Cerpa M., Hidrodestilación de Aceites esenciales modelado y caracterización, Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, pp. 15, Abril del 2007.



Fotografía 03: Envasado del A.E.



Elaboración: La Autora

Fotografía 04: Almacenamiento del A.E.



Elaboración: La Autora

3.4. Determinación de la humedad y rendimiento de la materia vegetal

3.4.1. Humedad

Se procedió a tomar una muestra de la materia vegetal, se la cortó en pedazos pequeños aproximadamente de 1g. Posteriormente se la colocó en cápsulas de porcelana, se hizo por triplicado para obtener un promedio de las mismas. (Ver Anexo 2). Se utilizó una lámpara UV, un desecador y balanza analítica.

La fórmula para el cálculo de la humedad fue la siguiente:

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

3.4.2. Rendimiento

El aceite esencial obtenido se lo recoge en una probeta y se midió el volumen y junto con el peso de la muestra se determina el rendimiento. (Ver Anexo 3).

La fórmula para el cálculo del rendimiento fue la siguiente:

$$R = \frac{V}{p} \times 100$$



3.5. Determinación de propiedades físicas del aceite esencial:

3.5.1. Densidad relativa

El principio en que se basa, es en la determinación de la masa de un determinado volumen de aceite esencial, expresada en g/mL, a una temperatura dada 20°C. La densidad se representa por "d" ¹⁸.

La densidad del aceite esencial de las tres recolecciones se determinó según la norma AFNOR NF T 75 – 111, se mezclaron los tres aceites esenciales de cada recolección y se realizaron tres repeticiones obteniendo una densidad promedio para cada muestra.(Ver Anexo 4)

En la fotografía N° 05 nos indica el picnómetro conteniendo el aceite esencial para determinar el rendimiento.

Fotografía 05: Peso del picnómetro con el aceite esencial



Elaboración: La Autora

3.5.2. Índice de refracción

El índice de refracción de una sustancia dada, es la relación entre la velocidad de un rayo de luz en el vacío y la velocidad de la luz a través de la sustancia, es igualmente la relación del seno del ángulo de incidencia al seno del ángulo de refracción de un rayo luminoso¹⁸.

El índice de refracción de los aceites esenciales se determinó según la norma AFNOR NF T 75 – 112.

¹⁸.Merlloño Q, El Aceite Esencial de limón producido en España. Contribución a su evaluación por Organismos Internacionales, Murcia, pp.131, 1999.



En la fotografía 06 se indica el refractómetro ABBE, que se utilizó para determinar el índice de refracción en el laboratorio del CETTIA – UTPL (Ver Anexo 5).

Fotografía 06: Refractómetro



Elaboración: La Autora

3.6. Determinación de la composición química del aceite esencial

Para identificar los componentes químicos del aceite esencial de la especie *Gnaphalium elegans* se utilizó la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas CG – MS y al Detector de Ionización de Llama CG – FID, obteniendo resultados cualitativos y cuantitativos, se realizó en dos columnas capilares DB-5MS(5%-Fenil)-metilpolisiloxano) y HP-INNOWAX (Polietilen Glicol).

Para la obtención de los cromatogramas como se indica en la fotografía 07 se utilizó el equipo Cromatógrafo de Gases Agilent serie 6890N, acoplada a un Espectrómetro de Masas Agilent serie 5973 inert, constituido con un sistema de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, el cual cuenta con un inyector automático split/splitless serie 7683, acoplado a un detector de ionización de llama.



Fotografía 07: Cromatógrafo de Gases

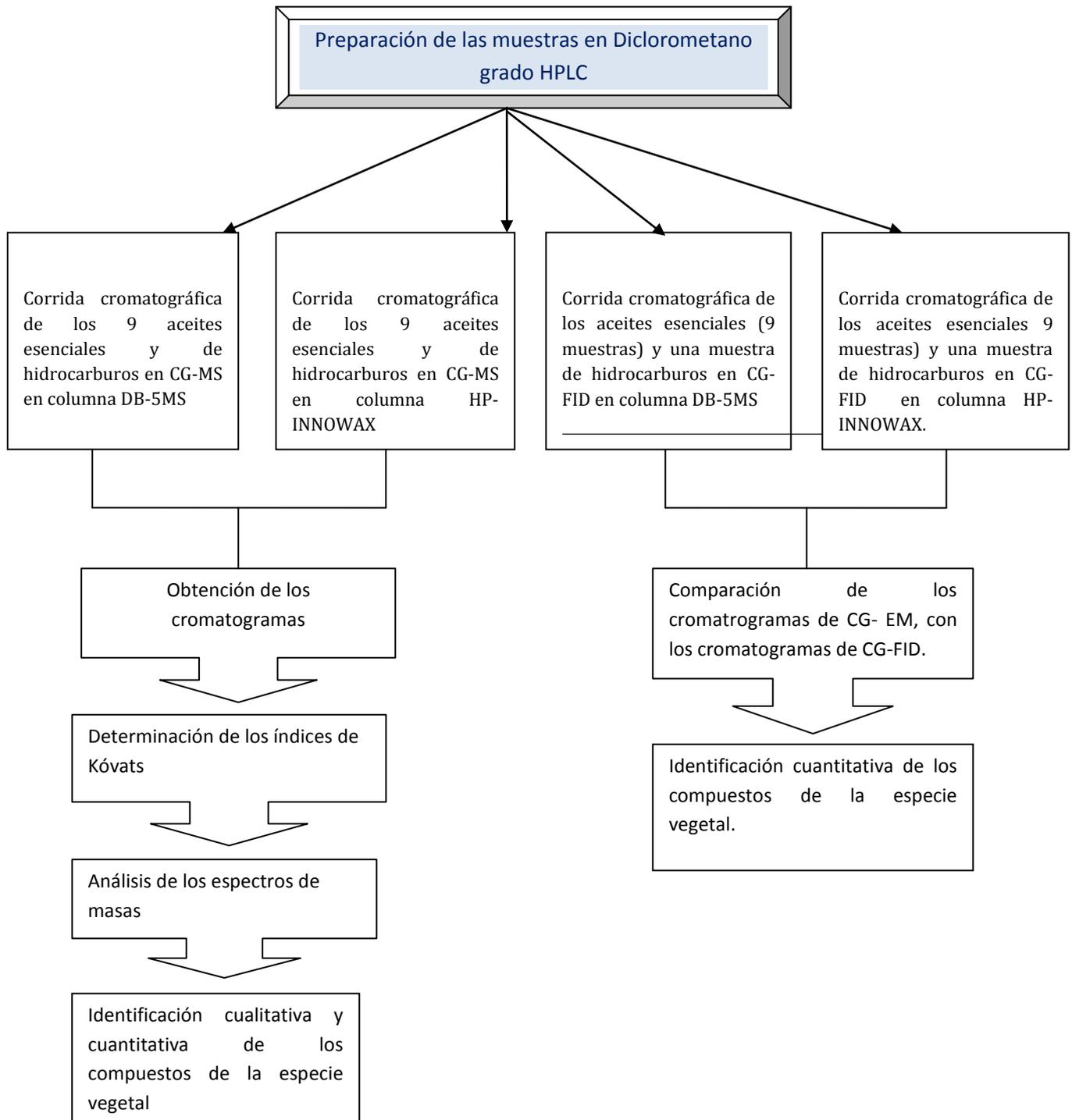


Elaboración: La Autora

A continuación en el gráfico 04 se detalla en un esquema de la secuencia de la corridas cromatográficas para la obtención de los diferentes cromatogramas e identificación química del aceite esencial de la materia vegetal.



GRÁFICO 04: Esquema de las corridas cromatográficas



Elaboración: La Autora



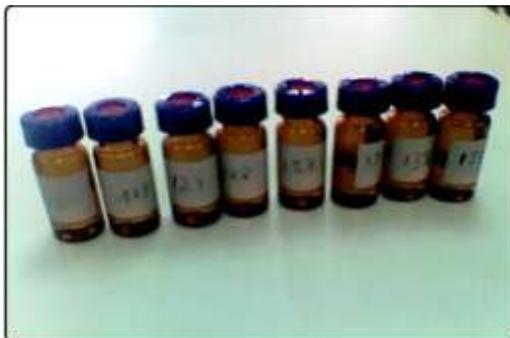
3.6.1. Preparación de las muestras

El material utilizado para preparar las muestras como: probetas, puntas, viales, fue totalmente limpio y codificado, para evitar que las muestras se contaminen o interfieran en el análisis de las mismas.

En la fotografía 08 con los 9 aceites obtenidos en un vial se colocó 990 μ l de diclorometano grado HPLC y luego con una micropipeta de 100 μ l se añaden 10 μ l de aceite esencial de *Gnaphalium elegans*, obteniendo 9 disoluciones a una concentración del 1%, posteriormente se hicieron las respectivas corridas cromatográficas.

Se prepararon los hidrocarburos de C₁₀ a C₂₅, con el mismo procedimiento mencionado anteriormente, se utilizaron los hidrocarburos y no el aceite esencial, que son inyectados en las columnas DB-5MS y HP-INNOWAX; el tiempo de retención de los hidrocarburos nos sirve de base en la determinación de índices de k_{ovats} en la identificación de cada uno de los compuestos.

Fotografía 08: Viales conteniendo aceite esencial con diclorometano



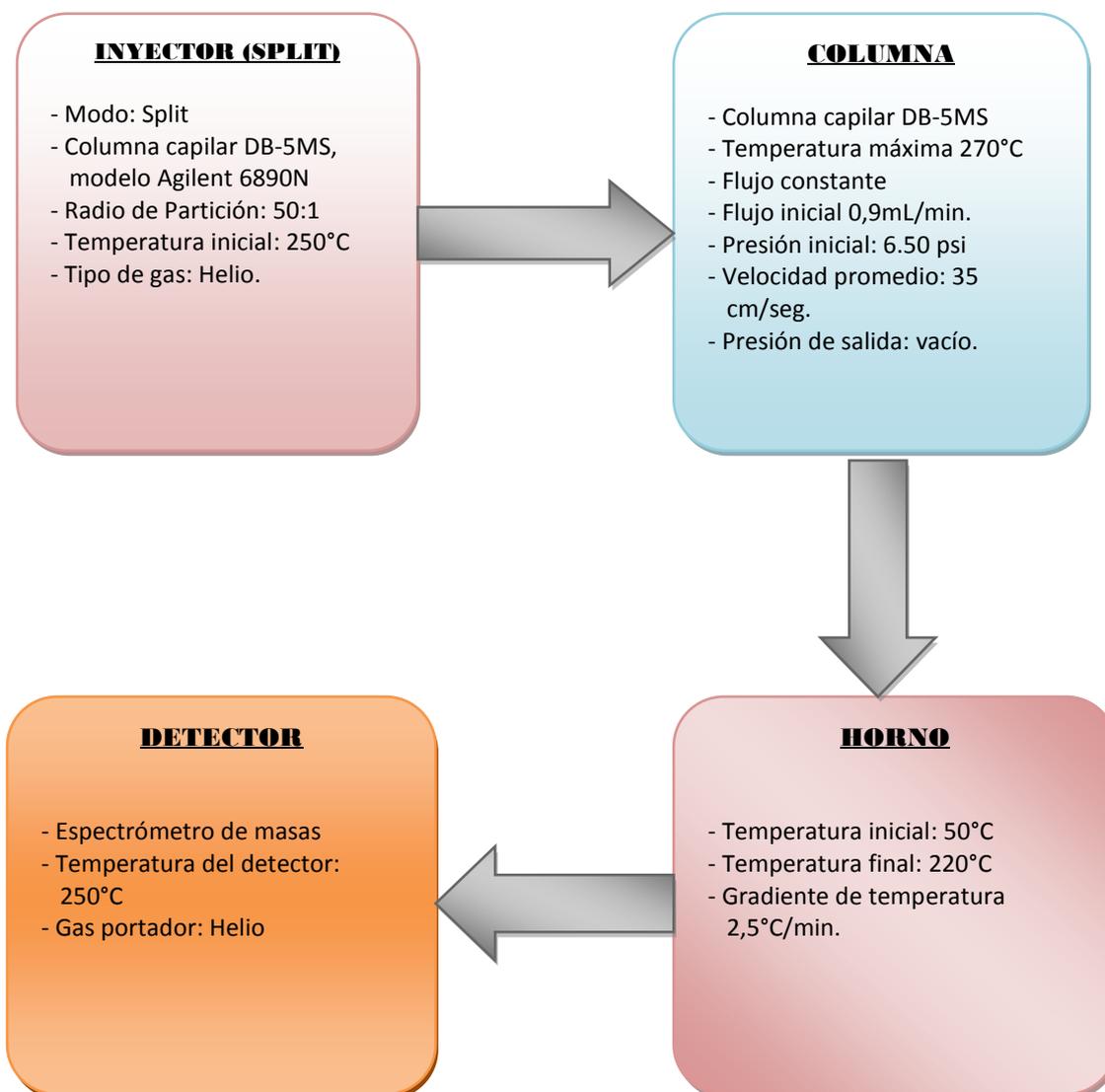
Elaboración: La Autora

3.6.2. Corrida cromatográfica de las muestras por CG-MS en la columna capilar DB-5MS

En el gráfico 05 se indican las muestras de aceites esenciales de *Gnaphalium elegans* que se inyectaron bajo parámetros operacionales utilizando Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas CG-MS usando la columna (DB-5MS), igualmente con estos parámetros fueron inyectados los hidrocarburos en DB-5MS.



GRÁFICO 05: Parámetros operacionales del CG-EM en la columna DB-5MS



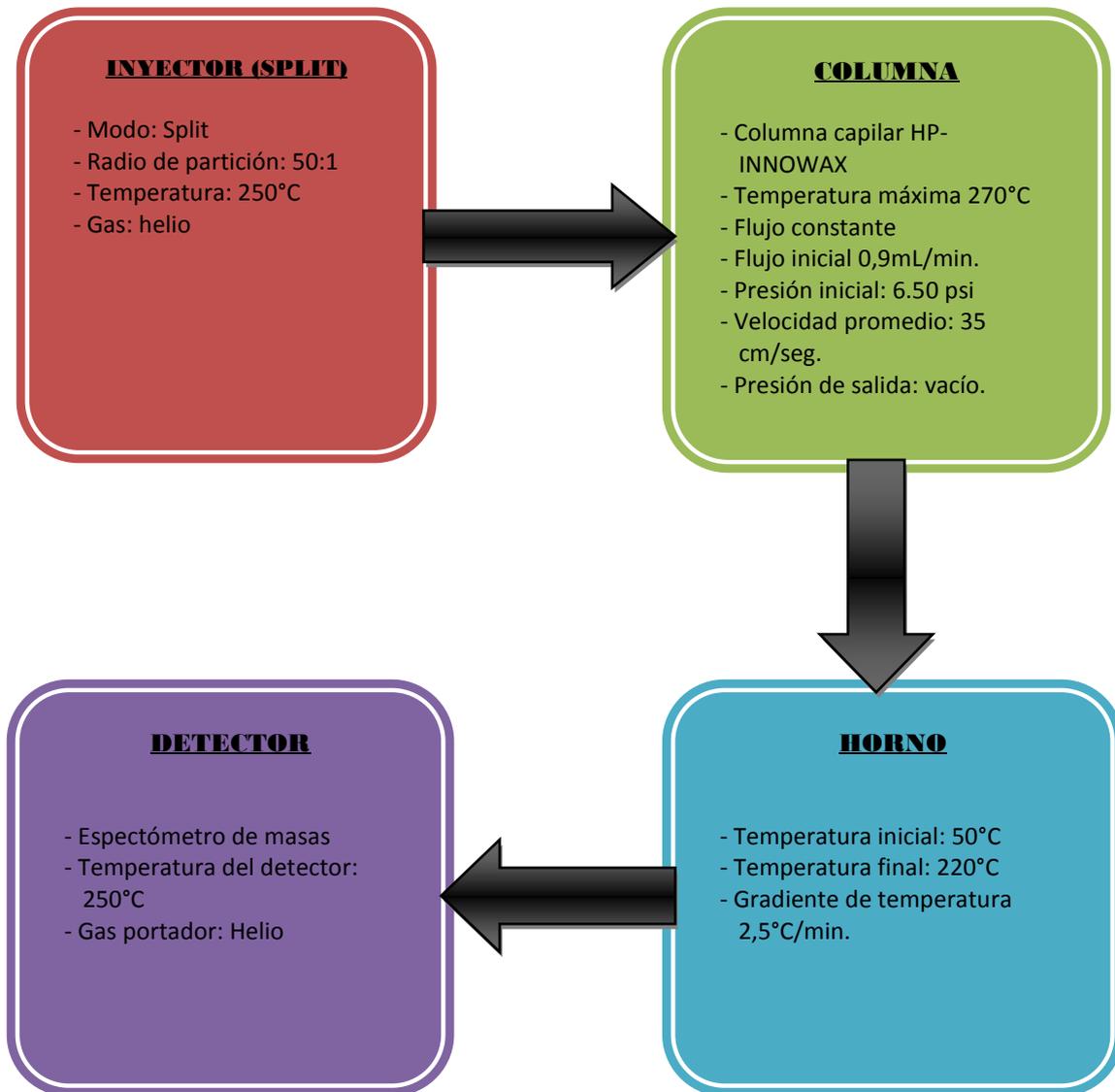
Elaboración: La Autora

3.6.3. Corrida cromatográfica de las muestras por CG-MS en la columna capilar HP-INNOWAX.

En el gráfico 06 se indican los parámetros operacionales bajo los cuales se inyectaron las muestras de aceites esenciales por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas CG-MS usando la columna polar (HP-INNOWAX).



GRÁFICO 06: Parámetros operacionales del CG-EM en la columna HP-INNOWAX.



Elaboración: La Autora

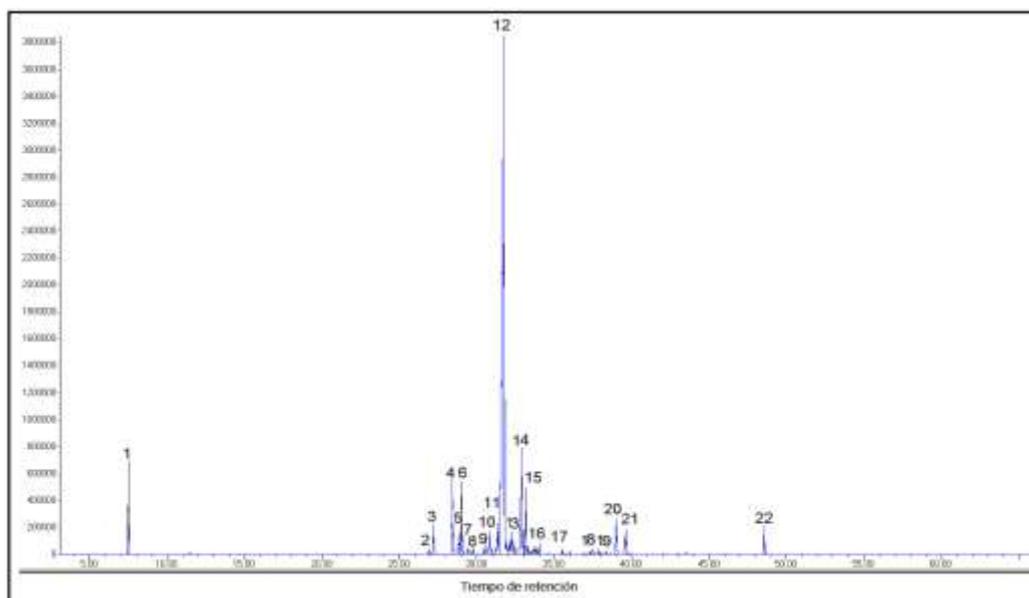


3.6.4. Obtención de los cromatogramas

Un cromatograma es la representación gráfica de la señal en función del tiempo, una vez que la muestra es inyectada a un sistema cromatográfico que da como resultado la separación de cada uno de los componentes químicos de la muestra analizada¹⁹.

En el gráfico 07 se indica un cromatograma del aceite esencial muestra 131 en DB-5MS en la cuál se utilizó un Cromatógrafo de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

GRÁFICO 07: Cromatograma del aceite esencial *G.elegans* muestra 131 en DB-5MS



Elaboración: La Autora

3.6.5. Determinación de los Índices de Kóvats

Para la identificación de los componentes de un aceite esencial mediante CG se ha utilizado frecuentemente la comparación de sus tiempos de retención (tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición del pico cromatografico) con los de los patrones, sin embargo, los tiempos de retención está fuertemente influenciados por numerosas variables, como la técnica de inyección, las variaciones de temperatura o flujo de los gases, el diseño del equipo, etc.⁶.

¹⁹Guía de Cromatografía, 2008, Universidad Central de Venezuela, Escuela de Química, Facultad de Ciencias Instrumental Analítico, Caracas, pp. 3.

⁶Bandoni Arnaldo, Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica, Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, 1ª ed., Buenos Aires, pp. 27, 2002.



Para determinar los índices de kóvats se compararon los tiempos de retención de los hidrocarburos obtenidos con el tiempo de retención de los componentes del aceite esencial de *Gnaphalium elegans* utilizando la siguiente fórmula:

$$I_k = 100n + 100 * \frac{(t_{Rx} - t_{Rn})}{(t_{RN} - t_{Rn})}$$

Donde

I_k = Índice de kóvats

n = Número de átomos de carbono en el *n*-alcano

t_{Rx} = Tiempo de retención del compuesto estudiado, que eluye en el centro de los *n*-alcanos.

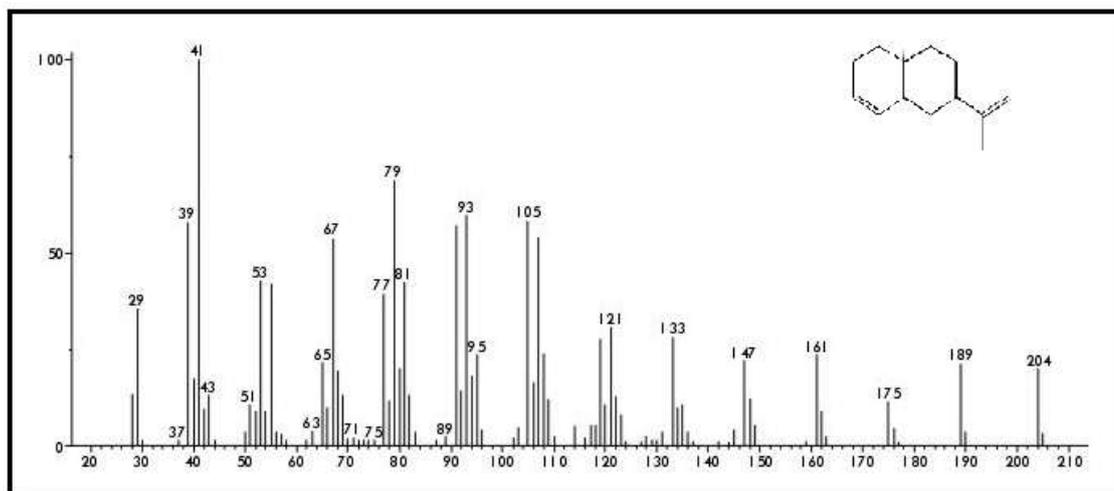
t_{Rn} = Tiempo de retención del *n*-alcano, que eluye antes del compuesto estudiado.

t_{RN} = Tiempo de retención del *n*-alcano, que eluye después del compuesto estudiado

3.6.5.1. Identificación de los compuestos en CG-EM en las columnas capilares DB-5MS y HP-INNOWAX.

- ❖ **Análisis de los espectros de masas:** El gráfico N°08 se observa un ejemplo de datos espectrales del compuesto alfa-seliene.

GRÁFICO 08: Datos espectrales del compuesto alfa selinene



Elaboración: La Autora



- ❖ La espectrometría de masas es la producción de iones a partir de compuestos neutros y la observación de la subsiguiente descomposición de esos iones. En un espectro de masas, observamos en abscisas, la relación masa/carga (m/z) de los iones formados al fragmentarse la molécula y en ordenadas la intensidad (abundancia) de cada uno de los iones formados⁶.
- ❖ **Identificación cualitativa de los compuestos del aceite esencial de la materia vegetal.**

Los compuestos de la materia vegetal arrojaron datos, los mismos que fueron procesados mediante un sistema computarizado que incluyen un proceso posterior completo, se utiliza un software propio para este método, dando como resultado la integración y el número de compuestos presentes en el aceite esencial, que seguidamente van a ser identificados.

Para el análisis cualitativo de los componentes químicos del aceite esencial, se determinaron los Índices de Kóvats de los picos detectados en columnas (DB-5MS y HP- INNOWAX), mediante un análisis de los espectros de masas dados para cada uno de los picos detectados, se realizó una comparación del espectro del pico con los propuestos en la librería WILLEY el cual nos da un CAS para cada compuesto.

Se hizo una comparación de los tiempos de retención de compuestos conocidos, con los de compuestos que se desea identificar, cuya diferencia entre estos valores determinados debe ser menor o igual a 50 unidades, y con ello identificar los componentes del aceite esencial en función de los índices de kóvats y el análisis de los espectros de masas.

⁶Bandoni Arnaldo, Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica, Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, 1ª ed., Buenos Aires, pp. 27, 2002.



3.6.6. Corrida cromatográfica de las muestras por CG-FID en la columna capilar DB-5MS

El detector de ionización de llama (CG-FID) es uno de los detectores más utilizados en la cromatografía de gases, en él se produce una llama de hidrógeno (H_2)/aire, en esta llama se queman aquellos compuestos que tienen enlaces H-C y se mide la diferencia de potencial producida por los iones formados: este tipo de detector se emplea para determinar hidrocarburos (C_nH_m) u otros compuestos orgánicos a nivel de trazas²⁰.

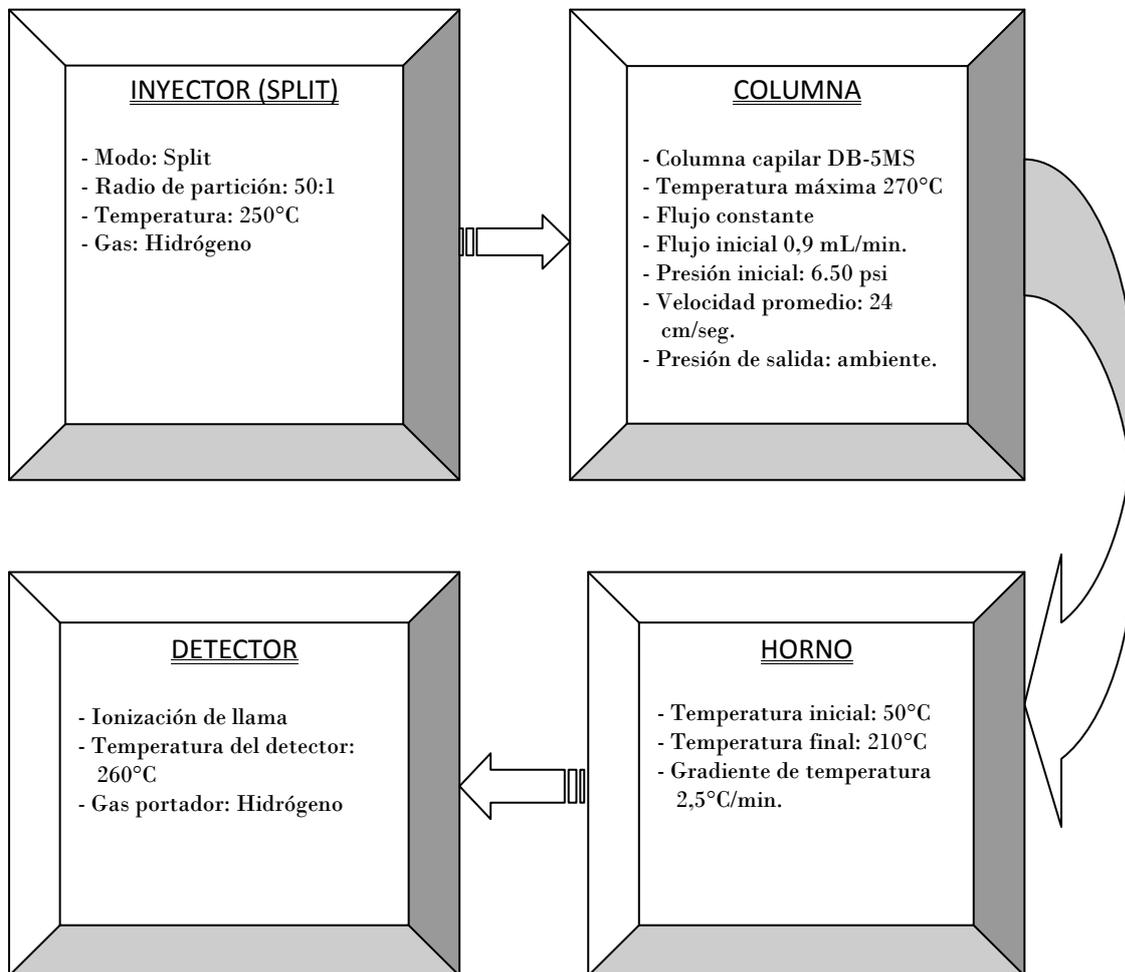
El FID es un detector especialmente adecuado para medidas cuantitativas, en él se mide, registra y amplifica el flujo iónico resultante de la ionización de las moléculas en una llama de hidrógeno (gases de combustión necesarios: hidrógeno y aire comprimido). Es un detector dependiente del flujo de masa, es decir, la señal es tanto mayor, cuánta más sustancia se ioniza en la llama en la unidad de tiempo²⁰.

En el gráfico 09 se indican los parámetros operacionales bajo los cuales se inyectaron las muestras de aceites esenciales, utilizando Cromatografía de Gases acoplado al Detector de Ionización de Llama CG – FID usando la columna polar **(DB-5MS)**.

²⁰Abello L., Entidad Nacional de Acreditación, Gases para instrumentación analítica, Madrid, pp. 19, 2001.



GRÁFICO 09: Parámetros operacionales para la columna capilar DB-5MS para CG-FID



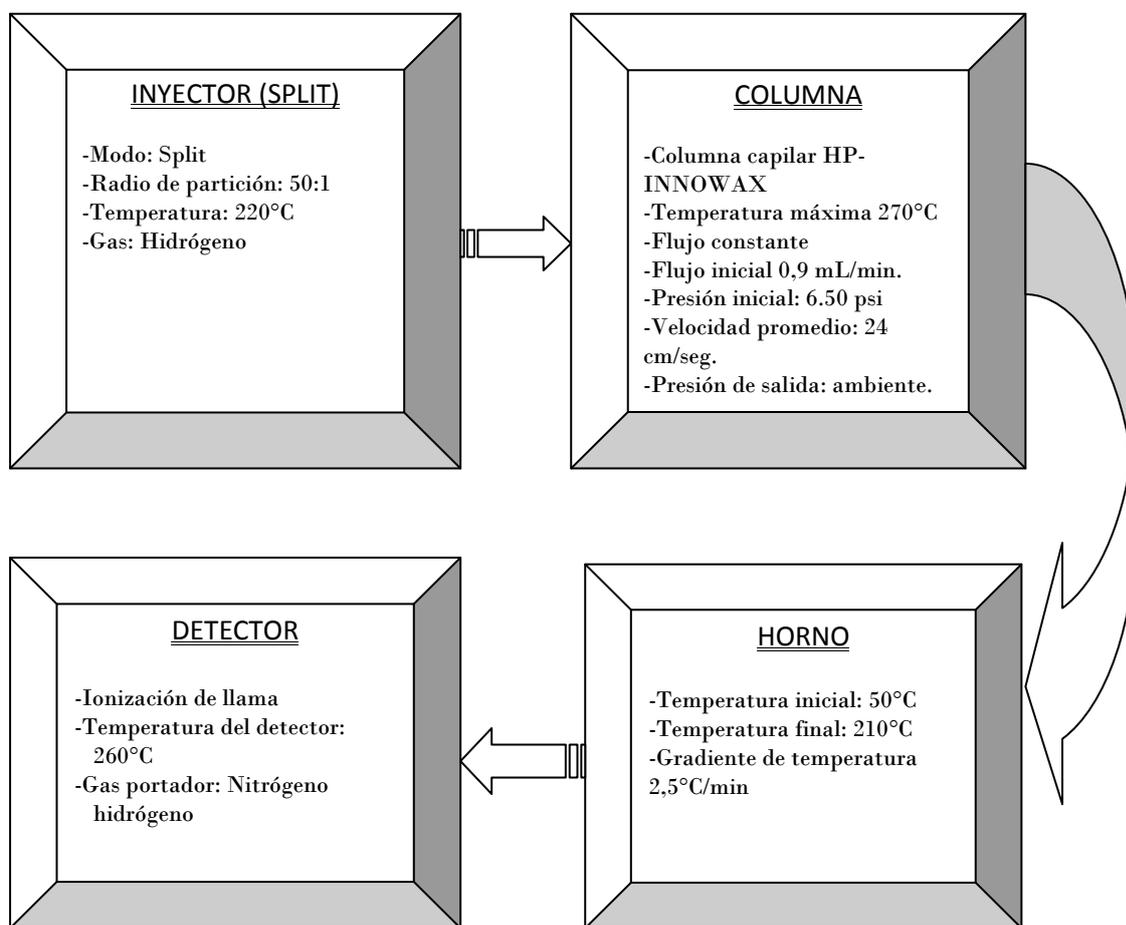
Elaboración: La Autora

3.6.7. Corrida cromatográfica de las muestras por CG-FID en la columna capilar HP-INNOWAX

En el gráfico 10 se indican los parámetros operacionales bajo los cuales se inyectaron las muestras de aceite esencial de *Gnaphalium elegans* por Cromatografía de Gases acoplado al Detector de Ionización de Llama CG-FID usando la columna polar (HP-INNOWAX).



GRÁFICO 10: Parámetros operacionales para la columna capilar HP-INNOWAX para CG-FID



Elaboración: La Autora

3.6.8. Identificación de los compuestos en CG-FID en las columnas capilares DB-5MS y HP-INNOWAX.

✚ Comparación de los cromatogramas obtenidos en CG-MS con los cromatogramas obtenidos en CG-FID

Los cromatogramas obtenidos en CG-MS se compararon con los cromatogramas de CG-FID, el tiempo de retención sirvió de base para la identificación de cada uno de los compuestos químicos del aceite esencial.

Los hidrocarburos se utilizó para correlacionar los tiempos de retención obtenidos en CG-FID, con los tiempos de retención obtenidos en CG- EM.



3.7. Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica

La actividad biológica de los aceites esenciales dependen de sus componentes, elementos, estructuras y concentraciones en los que se hallen presentes.

3.7.1. Pruebas antimicrobianas

El material de vidrio, medios de cultivo, puntas de 100 μL y de 1000 μL para micropipetas y dimetil sulfóxido (DMSO) fueron esterilizados en autoclave a 120 $^{\circ}\text{C}$, por 15 min a 1.5 atm.

En la fotografía 09 se observa los medios de cultivo utilizados para bacterias los cuales fueron: Caldo Muller Hinton, Caldo Infusión cerebro, Caldo Trypticase, Caldo Oxoid; para las pruebas antifúngicas el Caldo Saboraud.

Como control en las pruebas microbianas fue la Gentamicina y Ampicilina y en las pruebas antifúngicas Itraconazol.

Fotografía 09: Medios de cultivo



Elaboración: La Autora

3.7.2. Preparación del aceite esencial de la *Gnaphalium elegans*

La muestra (aceite) se usó tanto para CMI antibacterianos y antifúngicos, en la que se realizó una dilución de 20 μL del aceite esencial en 980 μL de DMSO.



3.7.3. Microorganismos en prueba

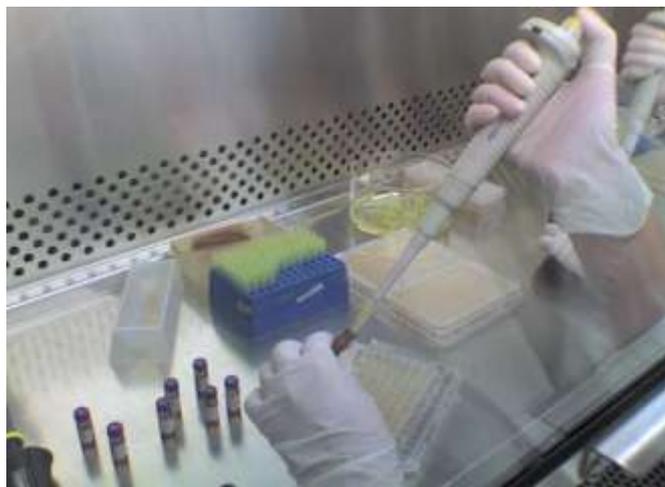
Se evaluó la actividad antibacteriana del aceite esencial *Gnaphalium elegans*, en las que se probó en cinco cepas Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 9997, *Proteus vulgaris* ATCC® 8427, *Escherichia coli* ATCC® 25922 y *Salmonella Typhimurium* LT2; 2 cepas Gram positivas: *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, para la evaluación de la susceptibilidad bacteriana. Así mismo, se emplearon tres organismos fúngicos de hongos esporulados como *Aspergillus niger* ATCC® 9642-U, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC® 28185 y *Trichophyton rubrum* ATCC® 28188.

3.7.4. Microdilución en caldo (Concentración mínima inhibitoria)

3.7.4.1. Preparación del cultivo Overnight (Bacterias)

En la fotografía 10, se observó medios de cultivo adecuados para cada una de las cepas bacterianas que se encontraban en reservas criogénicas a -80°C , se las inoculó y se las encubó por 24 horas a 37°C .

Fotografía 10: Siembra de bacterias



Elaboración: La Autora



3.7.4.2. CMI antibacterianos

La CMI mide la capacidad del agente antimicrobiano para inhibir la multiplicación del microorganismo. En consecuencia los microorganismos presentes en el inóculo pueden ser "sólo inhibidos" por el compuesto antibacteriano ²¹.

Se utilizó placas esterilizadas de 96 pocillos, se sometió el aceite esencial a cada uno de los microorganismos a prueba incubados durante 24h a 37°C, se ajustó la población bacteriana 3×10^6 ufc/mL con Caldo Muller-Hinton que fueron colocados en cada pocillo 100 μ L al final de la prueba excepto en el control de esterilidad, siendo ajustada la cantidad de 5×10^5 ufc/mL en un volumen total de 200 μ L.

Se procedió a colocar 180 μ L de caldo Muller-Hinton al primer pocillo y 100 μ L a todos los demás pocillos restantes, luego se añadió 20 μ L del compuesto a probar (aceite) diluído en DMSO en el primer pocillo. Se realizaron diluciones seriadas, tomando 100 μ L del primer pocillo y diluyendo con 100 μ L del pocillo siguiente y se continúa este procedimiento hasta el último pocillo donde está la concentración mínima a la que se quiere llegar, de este último se toman 100 μ L y se desecha, quedando así 100 μ L de medio + aceite en cada pocillo. Realizando el mismo procedimiento anterior, se empleó tres controles: Esterilidad, DMSO y de Antibióticos (Gentamicina y Ampicilina) es decir: 180 μ L de Caldo+ 20 μ L de aceite; 180 μ L de caldo+ 20 μ L de DMSO para control de crecimiento y 180 μ L de caldo+ 20 μ L Gentamicina o Ampicilina como control positivo. Se sellaron las placas con parafilm y se incubaron por 24h a 37°C, la prueba se realizó por triplicado.

3.7.4.3. CMI antifúngicos

La evaluación antifúngica se utilizó la misma solución de trabajo empleada en CMI con bacterias (20 μ L del aceite esencial en 980 μ L de DMSO); se siguió el mismo procedimiento mencionado anteriormente como es la de una dilución seriada variando únicamente ciertos parámetros: la concentración final del inóculo 5×10^4 esporas/mL, se realizó diluciones seriadas hasta obtener 12 diluciones consecutivas y el control positivo que se emplea una solución de 1mg/mL de Itraconazol. Se incubó las placas a 28°C de 24-96h. La prueba con cada hongo se realizó por triplicado.

²⁰Abello L., 2001, Entidad Nacional de Acreditación, Gases para instrumentación analítica, Madrid, pp. 19.

²¹ Flores E., Velasco P., Figueroa N., Jimenez A., Aceites Esenciales con Propiedades Antimicrobianas, Universidad Mayor de San Andrés, Instituto de Investigaciones Fármacos Bioquímicas, Área Temática de Química Farmacéutica, Diciembre de 1999.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS Y RESULTADOS



IV. ANÁLISIS Y RESULTADOS

4.1. Estado fenológico de la materia vegetal

El estado fenológico en la que fue recolectada la materia vegetal *Gnaphalium elegans* se indica a continuación en la tabla 1:

Tabla 1. Estado fenológico de la materia vegetal

MATERIA VEGETAL	*CÓDIGO	ESTADO FENOLÓGICO
<i>Gnaphalium elegans</i>	111	Floración
	112	
	113	
	121	Floración
	122	
	123	
	131	Floración
	132	
	133	

*Se asignó código para cada una de las muestras. Los números se refieren: el primero (1) al lugar de recolección -Saraguro; el segundo (1,2 y 3) para las tres recolecciones y el tercer número (1,2 y 3) para cada una de las destilaciones durante la obtención del AE.

Fuente: Investigación directa
Elaboración: La autora

4.2. Determinación de la humedad

En la tabla 2 se detalla los porcentajes de humedad, promedio de las tres recolecciones realizadas. El promedio de humedad mayor fue en la tercera recolección (73%) y el menor fue para primera recolección (64%).

De acuerdo a estos resultados se puede observar que hay una variación en la humedad, puesto que fue recolectada en distintos periodos de tiempo, en las cuales las condiciones climáticas son diferentes.



Tabla 2. Humedad promedio de las muestras

Recolección	* Código	(%) H	\bar{x}	σ	CV
1	111	65	64	1,53	0,02
	112	64			
	113	62			
2	121	73	71	2,08	0,02
	122	70			
	123	69			
3	131	75	73	1,53	0,02
	132	73			
	133	72			

H Humedad

\bar{x} Promedio de las tres muestras de cada recolección

σ Desviación estándar de las tres muestras de cada recolección

CV Coeficiente de variación

Fuente: Investigación directa

Elaboración: La autora

4.3. Determinación del rendimiento del aceite esencial

En la tabla 3 se detalla el porcentaje de rendimiento promedio con las nueve muestras de aceite esencial de la materia vegetal de *Gnaphalium elegans*, el mayor rendimiento fue en la tercera recolección (0,13%), mientras que el menor rendimiento fue en la primera recolección (0,10%).

Tabla 3. Rendimiento promedio de las muestras

Recolección	* Código	(%) R	\bar{x}	σ	CV
1	111	0,11	0,10	0,03	0,30
	112	0,12			
	113	0,07			
2	121	0,10	0,12	0,02	0,16
	122	0,13			
	123	0,13			
3	131	0,14	0,13	0,01	0,07
	132	0,13			
	133	0,13			

R Rendimiento

\bar{x} Promedio de las tres muestras de cada recolección

σ Desviación estándar de las tres muestras de cada recolección

CV Coeficiente de variación

Fuente: Investigación directa

Elaboración: La autora



Hay factores que influyen en el rendimiento del aceite esencial tales como: características genéticas de la planta, por el lugar, maduración o edad de la planta, así mismo la cantidad de materia vegetal que se utilizó para destilar, cantidad de agua, temperatura y presión¹⁷

4.4. Propiedades físicas del aceite esencial

El aceite esencial obtenido de *Gnaphalium elegans* es líquido a temperatura ambiente de color amarillo claro.

4.4.1. Densidad

En la tabla 4 se detallan los valores de la densidad, en la que es la mezcla de los tres aceites para cada recolección, el aceite esencial de mayor densidad fue de la tercera recolección (0,9365 g/cm³), y el de menor fue la primera recolección (0,9223 g/cm³).

La densidad promedio del aceite esencial obtenida de las tres recolecciones es de 0,9303 g/cm³ y de la desviación estándar es de 0,012.

Tabla 4. Densidad relativa de la mezcla de los tres aceites de cada recolección

Recolección	n^{20}	\bar{x} (g/cm ³)	σ	CV
1	0,9223		0,012	0,013
2	0,9321	0,9303		
3	0,9365			

d₂₀ Densidad relativa a 20°C

²⁰

\bar{x} Promedio de las tres muestras de cada recolección

σ Desviación estándar de las tres muestras de cada recolección

CV Coeficiente de variación

Fuente: Investigación directa

Elaboración: La autora

¹⁷Sandoval J., Evaluación del Rendimiento en la Extracción de Aceite Esencial de la hoja de Orégano (*Lippia graveolens*), variando el tamaño de muestra y aplicando los Métodos de Arrastre con vapor e Hidrodestilación a nivel Laboratorio, pp. 19, 1999.



4.4.2. Índice de refracción

El índice de refracción mostrado en la tabla 5 se refiere a los valores promedios de las de las tres mezclas de aceite esencial de cada recolección. El valor más alto del índice de refracción fue de la segunda recolección (1,5021) el más bajo fue de la tercera (1,4925).

El promedio final del índice de refracción de las muestras obtenidas es de 1,4959 la desviación estándar 0,006.

Tabla 5. Índice de refracción media del aceite esencial

Recolección	n^{20}	\bar{x}	σ	CV
1	1,4932		0,006	0,004
2	1,5021	1,4959		
3	1,4925			

n^{20} Índice de refracción

\bar{x} Promedio de las tres muestras de cada recolección

σ Desviación estándar de las tres muestras de cada recolección

CV Coeficiente de variación

Fuente: Investigación directa
Elaboración: La autora

4.5. Composición química del aceite esencial de *Gnaphalium elegans* (Asteraceae).

Con el análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas CG-EM, se determinó la composición química que conforman el aceite esencial en estudio, se utilizó la columna DB-5MS y HP-INNOWAX.

En la tabla 6 el aceite esencial de *G.elegans* para la columna DB-5MS y HP-INNOWAX se identificaron 25 compuestos, que corresponden un 89,40% y 88,59% respectivamente, así mismo se indica los índices de Kóvats calculados como los reportados en la literatura, también se observa el porcentaje promedio relativo para cada compuesto de las dos columnas de las tres recolecciones que se hicieron y por último se indica la desviación estándar y coeficiente de variación de los porcentajes relativos obtenidos.



TABLA 6: Composición química del aceite esencial de *Gnaphalium elegans*

N°	COMPUESTO ^a	DB-5MS								HP-INNOWAX ^b							
		IK					% CANTIDAD RELATIVA ^e			IK					% CANTIDAD RELATIVA ^e		
		K ^c	K ^d	GE 11	GE 12	GE 13	X	Σ	CV	K ^c	K ^d	GE 11	GE 12	GE 13	X	σ	CV
1	α - pinene	942	938 ^f	3,73	3,54	3,44	3,57	0,10	0,0280	1018	1007 ^p	2,89	3,08	4,27	3,42	0,01	0,0028
2	α - cubebene	1368	1345 ^f	1,27		1,58	1,43	0,02	0,0140	1478	463 ^g	1,21		0,82	1,02	0,01	0,0115
3	α-copaene	1361	1376 ^f	2,04	1,30		1,67	0,04	0,0066			2,04		2,67	2,36	0,02	0,0115
4	Italicene	1396	1406 ^f	4,85	4,75	4,46	4,69	0,02	0,0055	1527	1543 ^h	1,04	3,81	2,79	2,55	0,03	0,0109
5	α-cedrene	1406	1409 ⁱ	1,53	1,06	1,74	1,44	0,00	0,0071	1548	1578 ⁱ	1,60	1,40	1,36	1,45	0,01	0,0250
6	β-caryophyllene	1411	1418 ^f	4,57	2,04	2,97	3,19	0,01	0,0022	1581	1618 ^g	9,90	4,75	7,99	7,55	0,01	0,0019
7	α-bergamotene	1436	1434 ^g	1,35	1,14	0,93	1,14	0,03	0,0200								
8	β-farnesene	1449	1443 ^g		1,63	1,01	1,32	0,02	0,0154								
9	Aromadendrene	1428	1441 ^f	1,30	1,39	0,91	1,20	0,02	0,0345	1590	1600 ^j	1,97	2,26	1,61	1,95	0,01	0,0035
10	γ-muurolene	1467	1477 ^f	2,56	2,08	1,87	2,17	0,02	0,0253	1674	1684 ^g	5,65	1,89	2,38	3,31	0,04	0,0126
11	α-muurolene	1490	1480 ^f	2,47	1,47	1,51	1,82	0,01	0,0175	1712	1727 ^g	1,81		1,04	1,42	0,01	0,0083
12	γ- curcumene	1476	1482 ^f	57,74	60,10	39,54	52,46	0,17	0,0052	1690	1680 ^h	7,77	53,22	30,48	30,49	0,22	0,0067
13	β-selinene	1480	1485 ^f	1,66	1,85	2,00	1,84	0,02	0,0323	1703	1711 ^k	1,33	1,09		1,21	0,04	0,0299



14	α -selinene	1488	1494 ^h	1,61	1,32	1,49	1,47	0,00	0,0340	1709	1724 ^g	1,62	1,11	1,31	1,34	0,02	0,0152										
15	α -Bisabolene	1495	1507 ^f		0,64	1,35	0,99	0,02	0,0172																		
16	γ -cadinene	1504	1513 ^g	1,46		1,90	1,68	0,01	0,0100																		
17	δ -cadinene	1511	1524 ^h	4,74	4,96	3,15	4,28	0,01	0,0026	1745	1749 ^g	11,54	5,80	10,61	9,32	0,04	0,0030										
18	α -cadinene	1527	1538 ^g	1,26	1,21		1,24	4,00	0,0476																		
19	α -bisabolol	1680	1683 ^g	2,46	1,17		1,81	0,01	0,0261	2213	2153 ^l	1,33	1,24	1,37	1,31	0,02	0,0160										
20	α -gurjunene									1514	1529 ^g	3,30	0,52	0,75	1,52	0,01	0,0070										
21	β -cubebene									1575	1558 ^m	0,84	0,50	0,89	0,74	0,01	0,0164										
22	β -gurjunene									1589	1593 ⁿ		0,72	0,80	0,76	0,01	0,0154										
23	β -bisabolene									1718	1726 ^o	1,24	2,20	2,24	1,90	0,02	0,0105										
24	α -curcumene									1769	1777 ⁿ	9,74	7,33	22,32	13,13	0,03	0,0023										
25	β -bisabolol									2145	2106 ^k	1,50	2,40	1,66	1,85	0,05	0,0180										
										*Total		89,40												*Total		88,59	

Los números se refieren: el primero (1) al lugar de recolección -Saraguro; y el segundo (2) promedio de los tres aceites de cada recolección.

GE: Gnaphalium elegans

a= Compuestos ordenados de acuerdo al kóvats leído en la columna DB-5MS de las tres recolecciones realizadas

b= Compuestos identificados solo en la columna HP-INNOWAX de las tres recolecciones realizadas

c= Índices de Kováts calculado en la columna DB-5MS y HP-INNOWAX

d= Índices de Kováts leído en la columna DB-5MS y HP-INNOWAX

e= Porcentajes promedio del porcentaje relativo de los compuestos identificados en ambas columnas

IK Ref., referencias: ^lref, ^gref, ^href, ^fref, ^kref, ^lref, ^mref, ⁿref, ^oref, ^pref,.

CV= Coeficiente de Variación

KI=Índice de Kóvats

σ =Desviación estándar

\bar{X} =promedio total del área de los compuestos químicos por cada recolección

*Sumatoria del % cantidad relativa encontrada el columna DB-5-MS y HP-INNOWAX

Fuente: Investigación directa

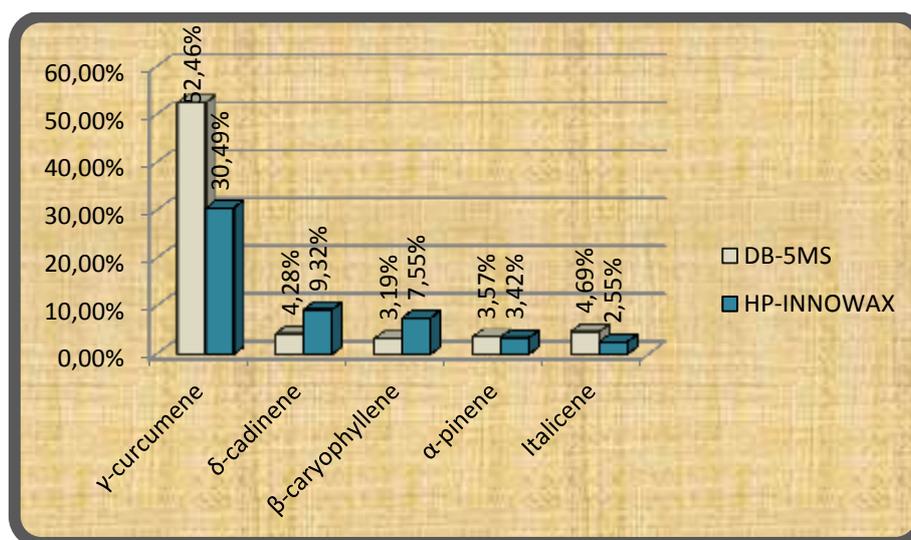
Elaboración: La autora



Los compuestos mayoritarios encontrados en ambas columnas fueron: γ -curcumene (41,48%); δ -cadinene (6,80%); β -caryophyllene (5,37%); α -pinene (3,50%); Italicene (3,62%) los mismos que pertenecen al grupo de los sesquiterpenos.

En el gráfico 11 se observa los compuestos mayoritarios del aceite esencial en las dos columnas DB-5MS y HP-INNOWAX.

GRÁFICO 11: Compuestos mayoritarios del aceite esencial de la materia vegetal *Gnaphalium elegans*



Fuente: Investigación directa
Elaboración: La autora

Hasta el momento no ha sido posible encontrar estudios referentes a la composición química del aceite esencial de esta especie.

Los componentes mayoritarios de los aceites esenciales, pueden constituir hasta un 85% del total, mientras que el resto se presentan como trazas. La concentración del compuesto concreto en el total de la mezcla de aceites de la planta puede ser muy variable, debido a condiciones climáticas, de crecimiento, destilación y la forma de almacenamiento ²³.

En la tabla 7 se observa el porcentaje relativo de los componentes del aceite esencial identificados en la columna DB-5MS-MS con los porcentajes dados en DB-5MS-FID y para la columna HPINNOWAX-MS Y HPINNOWAX-FID, también se observa promedio y desviación estándar para cada columna.

²³Dan Zekaria, Laboratorios Calier, Los aceites esenciales una alternativa a los antimicrobianos



TABLA 7: Porcentaje relativo de los componentes del aceite esencial de *Gnaphalium elegans* para CG-MS y CG-FID en la columna DB-5MS y HP-INNOWAX

N°	COMPUESTO ^a	DB-5-MS ^a										HP-INNOWAX ^b									
		GE 11		GE 12		GE 13		X		Σ		GE 11		GE 12		GE 13		X		σ	
		MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	HP-MS	FID	HP-MS	FID	HP-MS	FID	MS	FID	MS	FID
1	α - pinene	3,73	4,55	3,54	3,45	3,44	3,72	3,57	3,91	0,10	0,10	2,89	2,56	3,08	3,81	4,27	4,19	3,42	3,52	0,02	0,01
2	α - cubebene	1,27	5,82			1,58	3,08	1,43	4,45	0,02	0,01	1,21	0,68		0,57	0,82	1,70	1,02	0,98	0,02	0,00
3	α-copaene	2,04	1,08	1,30	1,27			1,67	1,18	0,04	0,03	2,04	1,98			2,67	2,08	2,36	2,03	0,02	0,01
4	Italicene	4,85	5,66	4,75	4,39	4,46	4,06	4,69	4,70	0,02	0,02	1,04	1,94	3,81	0,56	2,79	2,88	2,55	1,79	0,01	0,03
5	α-cedrene	1,53	1,00	1,06	1,94	1,74	1,10	1,44	1,35	0,00	0,01	1,60	1,19	1,40	1,27	1,36	1,59	1,45	1,35	0,00	0,01
6	β-caryophyllene	4,57	3,30	2,04	2,61	2,97	2,45	3,19	2,79	0,01	0,02	9,90	8,54	4,75	5,44	7,99	8,52	7,55	7,50	0,01	0,02
7	α-bergamotene	1,35	1,62	1,14	1,57	0,93	1,18	1,14	1,46	0,03	0,05										
8	β-farnesene			1,63	1,35	1,01	2,09	1,32	1,72	0,02	0,03										
9	Aromadendrene	1,30	1,65	1,39	1,42	0,91	1,31	1,20	1,46	0,02	0,02	1,97	0,53	2,26	1,37	1,61	1,48	1,95	1,13	0,03	0,02
10	γ-muurolene	2,56	1,46	2,08	1,16	1,87	0,56	2,17	1,06	0,02	0,02	5,65	0,96	1,89	1,63	2,38	1,10	3,31	1,23	0,04	0,03
11	α-muurolene	2,47	1,82	1,47	1,60	1,51	0,69	1,82	1,37	0,01	0,03	1,81	2,75			1,04	3,63	1,42	3,19	0,01	0,02
12	γ- curcumene	57,74	58,78	60,10	54,59	39,54	38,06	52,46	50,47	0,17	0,19	7,77	3,99	53,22	55,44	30,48	48,86	30,49	36,10	0,21	0,19
13	β-selinene	1,66	1,35	1,85	1,86	2,00	1,08	1,84	1,43	0,02	0,01	1,33	1,68	1,09	0,35			1,21	1,01	0,02	0,02
14	α-selinene	1,61	2,28	1,32	1,41	1,49	1,80	1,47	1,83	0,00	0,02	1,62	0,95	1,11	1,38	1,31	1,05	1,34	1,13	0,01	0,01
15	α-bisabolene			0,64	1,34	1,35	1,45	0,99	1,40	0,02	0,00										
16	γ-cadinene	1,46	0,38			1,90	1,56	1,68	0,97	0,01	0,02										
17	δ-cadinene	4,74	4,79	4,96	4,57	3,15	4,05	4,28	4,68	0,01	0,02	11,54	19,11	5,80	5,44	10,61	12,19	9,32	12,25	0,00	0,01
18	α-cadinene	1,26	1,76	1,21	1,25			1,24	1,50	0,04	0,00										
19	α-bisabolol	2,46	5,80	1,17	0,77			1,81	3,28	0,01	0,02	1,33	2,58	1,24	0,94	1,37	2,69	1,31	2,07	0,00	0,01
20	α-gurjunene											3,30	4,47	0,52	0,23	0,75	0,23	1,52	1,64	0,02	0,01
21	β-cubebene											0,84	0,93	0,50	0,27	0,89	0,62	0,74	0,61	0,00	0,01



22	β-gurjunene													0,72	0,34	0,80	0,22	0,76	0,28	0,06	0,08							
23	β-bisabolene										1,24	2,03	2,20	3,83	2,24	4,33	1,90	3,40	0,02	0,04								
24	α-curcumene										9,74	10,05	7,33	6,22	22,32	0,40	13,13	5,56	0,03	0,02								
25	β-bisabolol										1,50	0,60	2,40	2,19	1,66	1,15	1,85	1,32	0,01	0,04								
												*Total	89,40	91,01													88,59	88,09

GE: Gnaphalium elegans

a= Compuestos ordenados de acuerdo al kóvats leído en la columna DB-5MS de las tres realizadas

b= Compuestos identificados solo en la columna HP-INNOWAX de las tres realizadas

c= Índices de Kóvats calculado en la columna DB-5MS y HP-INNOWAX

d= Índices de Kóvats leído en la columna DB-5MS y HP-INNOWAX

e= Porcentajes promedio del porcentaje relativo de los compuestos identificados en ambas columnas

\bar{X} =promedio total del área de los compuestos químicos por cada recolección

σ =Desviación estándar

*Sumatoria del % cantidad relativa encontrada el columna DB-5-MS y HP-INNOWAX

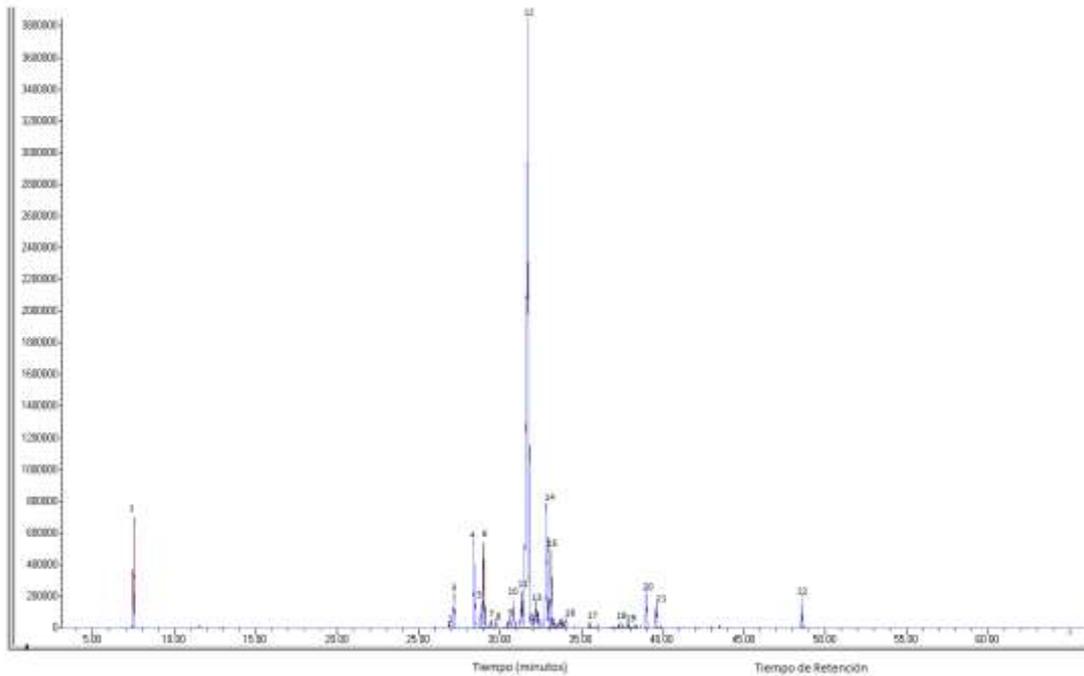
Fuente: Investigación directa
Elaboración: La autora



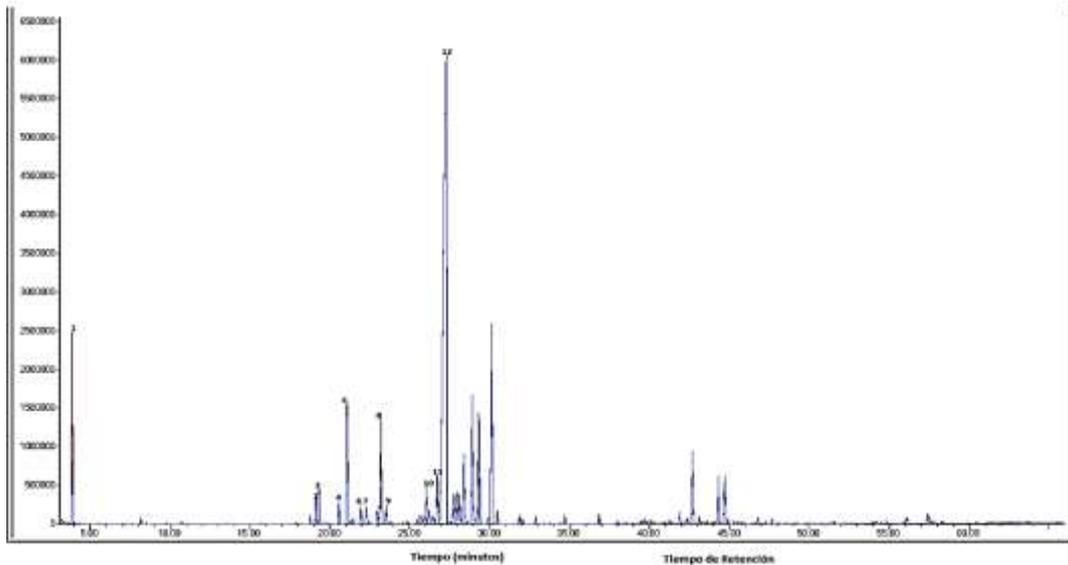
En el gráfico 12 (a,b) se muestran dos cromatogramas obtenidos del aceite esencial de *Gnaphalium elegans* de la muestra 121 para la columna DB-5MS y HP-INNOWAX.

GRÁFICO 12. Cromatograma de la materia vegetal *Gnaphalium elegans*.

a. Columna DB-5MS (muestra 121) en CG-EM



b. Columna HP-INNOWAX (muestra 121) en CG-EM



Fuente: Investigación directa
Elaboración: La autora



4.6. Espectros de masas

La identificación de los componentes de los aceites esenciales se realizó en base a sus espectros de masas (EM). En un espectro de masas, observamos, en abscisas, la relación masa/carga (m/z) de los iones formados al fragmentarse la molécula y en ordenadas la intensidad (abundancia) de cada uno de los iones formados. Dado que la carga suele ser unitaria, m/z corresponde generalmente a la masa de los fragmentos iónicos⁶.

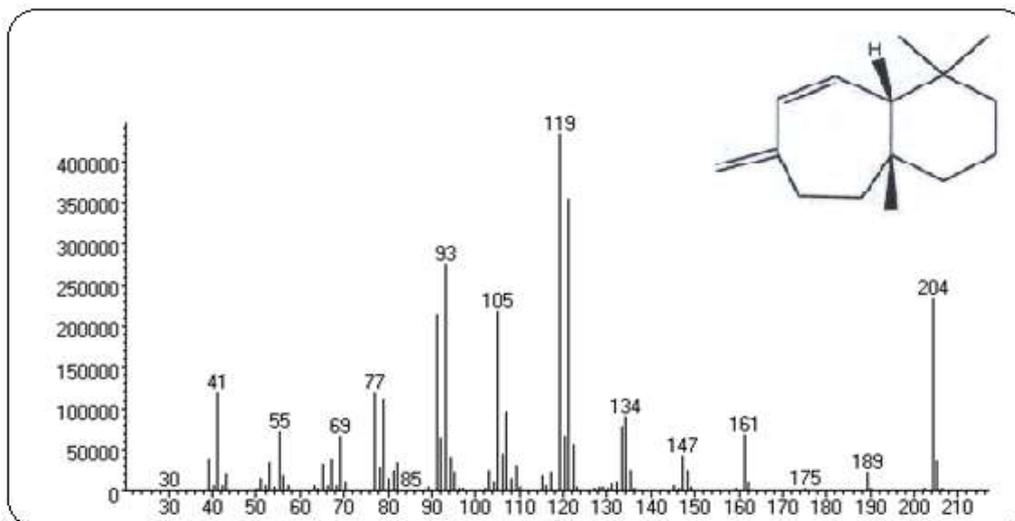
4.6.1. Datos espectrales de los compuestos mayoritarios de la materia vegetal *Gnaphalium elegans*

Con el equipo de Cromatógrafo de Gases se identificaron los picos cromatográficos que nos ayudaron a determinar los datos espectrales de los compuestos mayoritarios del aceite esencial.

En el gráfico 13 (a, b, c, d, e) se indican los datos espectrales de los compuestos mayoritarios del aceite esencial.

a. γ -curcumene

204(51,91), 189(4,88), 175(0,40), 161(15,09), 147(9,48), 134(20,18), 119(100), 105(48,47), 93(61,56), 85(0,14), 77(26,62), 69(14,84), 55(16,18), 41(26,50), 30(0,09).

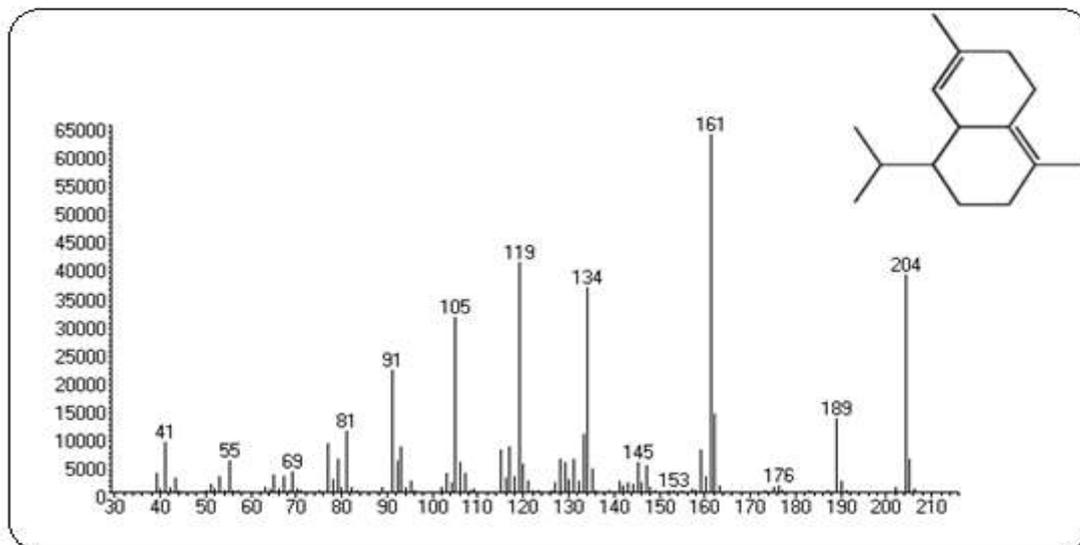


⁶Bandoni A., Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica, Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, 1ª ed., Buenos Aires, pp. 27, 2002.



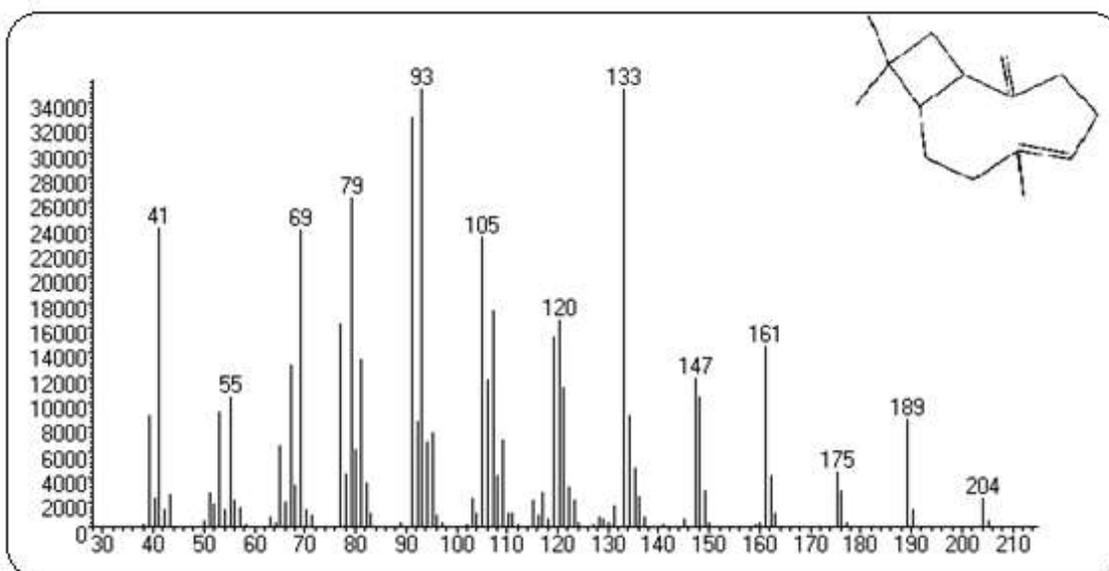
b. δ -cadinene

210(58,90), 189(19,95), 176(1,64), 161(100), 153(0,54), 145(7,87), 134(55,48), 119(62,53), 105(47,36), 91(32,96), 81(16,73), 69(5,58), 55(8,59), 41(13,64).



c. β -caryophyllene

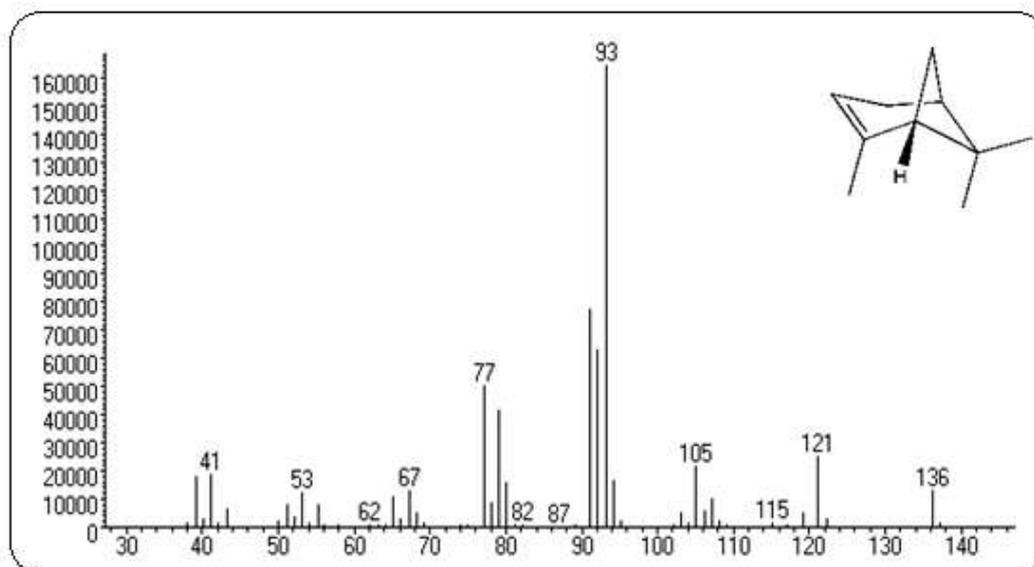
204(6,67), 189(23,88), 175(12,40), 161(40,37), 147(33,18), 133(100), 120(46,32), 105(64,75), 93(99,26), 79(73,56), 69(66,23), 55(28,97), 41(66,85)





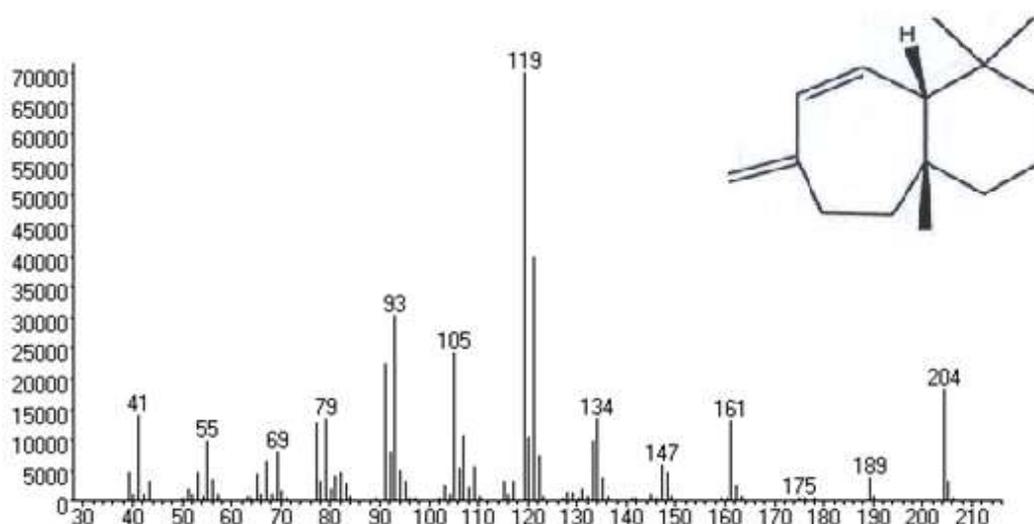
d. α -pinene

136(7,69), 121(15,07), 115(0,84), 105(12,55), 93(100), 87(0,13), 82(0,37), 77(29,74), 67(7,73), 62(0,51), 53(7,06), 41(10,86).



e. Italicene

204(25,21), 189(5,27), 175(0,53), 161(18,30), 147(8,26), 134(18,70), 119(100), 105(33,58), 93(41,82), 79(18,41), 69(11,08), 55(13,60), 41(19,22)



Fuente: Investigación directa
Elaboración: La Autora



4.7. Actividad antibacteriana y antifúngica

Generalmente los aceites esenciales poseen notables propiedades antimicrobianas y antifúngicas. Hasta la fecha la mayoría de los estudios realizados sobre las mismas, los aceites esenciales se han centrado en microorganismos patógenos para el hombre, así como en aquellos presentes en los alimentos²³. Los métodos empleados para evaluar la actividad antimicrobiana permitieron medir la susceptibilidad in vitro de los microorganismos frente a agentes antimicrobianos determinando la potencia de la sustancia, la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas de una droga de origen vegetal y a la concentración de la droga en el organismo humano²⁴.

4.7.1. Concentración mínima Inhibitoria (CMI) para bacterias

De acuerdo a los resultados obtenidos de las bacterias frente al aceite esencial no presentaron inhibición alguna, lo que nos permite establecer que no mostraron actividad con ninguno de los microorganismos en las concentraciones máximas evaluadas.

Debido a su actividad nula en los diferentes ensayos biológicos este aceite no podría ser una alternativa para la elaboración de un fitofármaco contra estos organismos, ya que estos son agentes etiológicos de brotes y de fácil transmisión entre pacientes hospitalizados; en los últimos años se ha observado un incremento en la resistencia de estas bacterias frente a los antimicrobianos²⁵.

4.7.2. Concentración mínima Inhibitoria (CMI) para hongos

Los hongos que se utilizaron fueron *Aspergillus niger* ATCC® 9642-U, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC® 28185, *Trichophyton rubrum* ATCC® 28188 y como control se utilizó Itraconazol 1mg/mL.

²³. Dan Zekaria, Laboratorios Calier, Los aceites esenciales una alternativa a los antimicrobianos.

²⁴. National Committee for Clinical Laboratory Standards. CLSI. Performance standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard- Ninth Edition. M2-A9: National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa., 2006.

²⁵ Davicino R., Mattar M., Casali Y., Correa S., Pettenati E., Micalizzi B., Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina, Revista Peruana de Biología Vol. 14, Lima Dic. 2007.



En la tabla 8 nos indica los valores de la CMI para los hongos evaluados de los 9 aceites de las 3 recolecciones realizadas: para el hongo *T.mentagrophytes* ATCC® 28185, las muestras de aceites esenciales *G. elegans* de la 111 hasta la 123 inhibieron a una concentración de 1000 µg/mL mientras que de la 131 a la 133 inhibieron a una concentración de 500 µg/mL. Para el hongo *T. rubrum* ATCC ® 28188, las muestras de aceites *G. elegans* de la 111 hasta la 123 inhibieron a una concentración de 500 µg/mL a diferencia de las muestras 131 a la 133 que inhibieron a una concentración de 1000 µg/mL. La CMI para el hongo *A. niger* ATCC® 9642-U no presentó ninguna inhibición, según Holetz manifiesta que una inhibición de CMI entre 500 µg/mL y 1000µ g/mL es débil, mientras que una CMI inferior o igual a 100 µg/mL, es buena.

Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria (CMI) para hongos

Concentración mínima Inhibitoria (µg/mL)					
Microorganismos					
Aceites	Tm	Tr	An	Control	
GE 111	1000	500	NA	7,81	
GE 112	1000	500	NA	7,81	
GE 113	1000	500	NA	7,81	
GE 121	1000	500	NA	7,81	
GE 122	1000	500	NA	7,81	
GE 123	1000	500	NA	7,81	
GE 131	500	1000	NA	7,81	
GE 132	500	1000	NA	7,81	
GE 133	500	1000	NA	7,81	

Hongos evaluados: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC ® 28185, *Trichophyton rubrum* ATCC ® 28188 y *Aspergillus niger* ATCC® 9642-U.

GE: *Gnaphalium elegans*

NA: no activo

Fuente: Investigación directa
Elaboración: El autor

Hasta el momento no se han encontrado investigaciones del aceite esencial *G.elegans* sobre bioactividad contra estos microorganismos, los mismos que causan infecciones frecuentes en humanos, así mismo están bien adaptados para utilizar una gran variedad de sustratos como fuente de carbono, nitrógeno y energía²⁶.

²⁶. Davicino R., Mattar M., Casali Y., Correa S., Pettenati E., Micalizzi B., Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina, Revista Peruana de Biología Vol. 14, Lima Dic. 2007.

²⁷. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz., 97:1027–312002.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES



V. CONCLUSIONES

1. El promedio de humedad mayoritario fue para tercera recolección (73%), y la de menor fue para la primera recolección (64%). El mejor rendimiento en aceite esencial fue de la tercera recolección (0,13%) la cual varía con respecto a las dos primeras en un 10% y un 12% respectivamente.
2. La densidad determinada del aceite esencial extraído de la especie vegetal *Gnaphalium elegans* con el valor más alto fue de la tercera recolección (0,9365 g/cm³), mientras que para la primera recolección fue más bajo (0,9223 g/cm³).
3. Para el índice de refracción el valor más alto fue de la segunda recolección con (1,5021), el más bajo fue de la tercera recolección (1,4925). El promedio final del índice de refracción de las muestras obtenidas fue de 1,4959 con una desviación estándar de 0,006.
4. El aceite esencial obtenido de la materia vegetal *Gnaphalium elegans* de las tres recolecciones se identificaron 25 compuestos del total del porcentaje relativo y que corresponden a un 89,40% para la columna DB-5MS y un 88,59% para HP-INNOWAX.
5. Los componentes químicos mayoritarios del aceite esencial fueron: γ -curcumene (41,48%); δ -cadinene (6,80%); β -caryophyllene (5,37%), α -pinene (3,50%), Italicene (3,62%) los mismos que pertenecen al grupo de los sesquiterpenos.
6. En cuanto a la actividad biológica, los aceites esenciales fueron inactivos frente a las bacterias en estudio, es decir no mostraron actividad con ninguno de los microorganismos en las concentraciones máximas evaluadas, por tanto no podrían ser utilizados en la elaboración de algún fitofármaco.



7. La CMI para *Trichophyton mentagrophytes* los aceites *G. elegans* de la 111 a 123 inhibió a 1000 $\mu\text{g/mL}$ a diferencia de la 131 a 133 inhibió a 500 $\mu\text{g/mL}$, para *Trichophyton rubrum* los aceites *G. elegans* de la 111 a 123 inhibió a 500 $\mu\text{g/mL}$ y de la 131 133 inhibió a 1000 $\mu\text{g/mL}$; mientras que para *Aspergillus niger* el aceite fue inactivo en las concentraciones probadas.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES



VI. RECOMENDACIONES

1. Continuar con el estudio de especies vegetales sean medicinales o aromáticas propias de la región Sur del Ecuador de las cuales no haya información bibliográfica y con ello tener un conocimiento más amplio de las mismas.
2. Realizar un estudio fitoquímico de esta especie vegetal y hacer una comparación de componentes con la presente investigación realizada.
3. Previamente para la recolección y estudio de un aceite esencial de cualquier especie vegetal se deberá verificar si su población es lo suficientemente abundante para obtener un buen rendimiento de aceite esencial, y nos arroje datos reales para futuros estudios de investigación.
4. Realizar estudios del aceite esencial de esta especie vegetal *Gnaphalium elegans* obtenido de otras zonas que sean de la Provincia de Loja y hacer una comparación tanto de su composición química, propiedades físicas y actividad biológica.

CAPÍTULO VII

ANEXOS



ANEXO I: SIGLAS Y NÚMEROS

AE	Aceite esencial
CG – EM	Cromatografía de Gases acoplado a la Espectrometría de Masas
CG – FID	Cromatografía de Gases acoplado al Detector de Ionización de Llama
Cv	Coeficiente de variación
IK	Índices de Kóvats
I.Q.A.	Instituto de Química Aplicada
Tr	Tiempo de retención
U.T.P.L.	Universidad Técnica Particular de Loja.
111	Aceite esencial de la especie <i>Gnaphalium elegans</i> (lugar 1, recolección 1 y destilación 1)
112	Aceite esencial de la especie <i>Gnaphalium elegans</i> (lugar 1, recolección 1 y destilación 2)
113	Aceite esencial de la especie <i>Gnaphalium elegans</i> (lugar 1, recolección 1 y destilación 3)
221	Aceite esencial de la especie <i>Gnaphalium elegans</i> (lugar 1, recolección 2 y destilación 1)
222	Aceite esencial de la especie <i>Gnaphalium elegans</i> (lugar 1, recolección 2 y destilación 2)
223	Aceite esencial de la especie <i>Gnaphalium elegans</i> (lugar 1, recolección 2 y destilación 3)
331	Aceite esencial de la especie <i>Gnaphalium elegans</i> (lugar 1, recolección 3 y destilación 1)
332	Aceite esencial de la especie <i>Gnaphalium elegans</i> (lugar 1, recolección 3 y destilación 2)
333	Aceite esencial de la especie <i>Gnaphalium elegans</i> (lugar 1, recolección 3 y destilación 3)



ANEXO II: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD

Determinación de humedad

En la determinación de la prueba de humedad se utilizó el siguiente equipo de laboratorio:

- Balanza analítica
- Lámpara UV y
- Desecador.

Se realizaron tres repeticiones de la materia vegetal para obtener una humedad promedio de las destilaciones obtenidas.

Procedimiento

- Pesar en una cápsula o luna de reloj aproximadamente 1 gramo de la muestra; seguidamente colocarla en la lámpara UV por 30min.
- Enfriar la cápsula en el desecador por 15 min. 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 lámpara UV durante 15min, enfriar en el desecador y pesar.
- Repetir el procedimiento hasta que el peso de la cápsula sea constante. Dicho peso se toma como m_2 .

La fórmula para el cálculo de la humedad es la siguiente:

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

Donde:

Hm = % de humedad promedio

m = peso de la cápsula vacía (g).

m_1 = peso de la cápsula + muestra (g).

m_2 = peso de la cápsula + muestra seca (g).



ANEXO III: DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los rendimientos de los aceites esenciales obtenidos en las destilaciones de la materia vegetal de las tres recolecciones se los obtuvo con la aplicación de la siguiente fórmula:

$$R = \frac{V}{p} \times 100$$

Donde:

R = rendimiento en %

V = volumen total del aceite esencial obtenido de la destilación por repetición (mL)

p = peso total de materia vegetal cargada en el destilador (g)



ANEXO IV: DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA A 20°C.

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.

Materiales:

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

Procedimiento:

Preparación del picnómetro:

El picnómetro antes de ser usado debe ser lavado previamente con etanol y luego con acetona, para posteriormente pasarlo por una corriente de aire seco. Si es necesario se debe secar la parte exterior del picnómetro. Luego de que se equilibre la temperatura en el cuarto de balanza, se debe pesar el picnómetro con el tapón en su sitio con 1mg de precisión.

Peso del agua destilada:

Para establecer el peso del agua destilada se debe llenar el picnómetro con agua recién destilada a 20°C. Luego se debe colocar el picnómetro en el baño termostático durante 30 minutos, a continuación se debe ajustar el nivel del agua hasta la marca, y se coloca en su sitio el tapón del picnómetro, posteriormente se debe secar el exterior del picnómetro. Luego se procede a equilibrar la temperatura en el cuarto de balanzas, y finalmente se debe pesar el picnómetro lleno con el tapón en su sitio con 1mg de precisión al igual que en el caso anterior.



Peso del aceite esencial:

Para determinar el peso del aceite esencial se debe vaciar el picnómetro, enjuagar y secar como en el inicio. Efectuar las mismas operaciones pero en lugar de agua utilizar aceite esencial.

Expresión de resultados:

La densidad relativa se la expresa con la siguiente fórmula

:

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

Donde:

d_{20}^{20} = densidad relativa a 20°C, referido al agua a 20°C.

m_0 = es la masa en gramos del picnómetro vacío.

m_1 = es la masa en gramos del picnómetro con agua.

m_2 = es la masa en gramos del picnómetro con el aceite esencial.

Nota: Se expresará los resultados con tres decimales.



ANEXO V: DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

Principio:

Según el aparato de laboratorio que utilicé, la medida directa del ángulo de refracción, o la observación del límite de refracción total. El aceite esencial será mantenido dentro de las condiciones de isotropismo y de transparencia.

Aparatos de laboratorio:

Refractómetro:

Se utiliza un refractómetro clásico que permita una precisión de ± 0.0002 y una lectura de los índices de refracción comprendidos entre 1.300 y 1.700.

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

1.6585 para el 1-bromo naftaleno.

1.5685 para el benzoato de bencilo.

1.4906 para el p-cimeno.

1.3330 para agua destilada.

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.

Procedimiento:

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

Antes de colocar la muestra en el instrumento, se la debe llevar a una temperatura igual a la que se realizará la medida.

Para efectuar la lectura esperar que la temperatura sea estable.



Resultados:

Cálculos.

La fórmula para la determinación del índice de refracción a la temperatura de referencia es la siguiente:

$$n_D^t = n_D^{20} + 0.0004 (t - 20)$$

Dónde:

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

0.0004 = factor de corrección

t = temperatura a la que se efectuó la temperatura

t = temperatura a 20°C

Nota:

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



ANEXO VI: DETERMINACIÓN DE LOS ÍNDICES DE KÓVATS

Para poder determinar los índices de kóvats se comparan los tiempos de retención de los hidrocarburos obtenidos con el tiempo de retención de los constituyentes del aceite esencial en estudio en base a la siguiente fórmula

$$Ik = 100n + 100 * \frac{(t_{Rx} - t_{Rn})}{(t_{RN} - t_{Rn})}$$

Donde

Ik = Índice de kóvats

n = Número de átomos de carbono en el *n*-alcano

t_{Rx} = Tiempo de retención del compuesto estudiado, que eluye en el centro de los *n*- alcanos.

t_{Rn} = Tiempo de retención del *n*-alcano, que eluye antes del compuesto estudiado.

t_{RN} = Tiempo de retención del *n*-alcano, que eluye después del compuesto estudiado



ANEXO VII: DESVIACIÓN ESTÁNDAR

La desviación estándar o desviación típica (σ) es una medida de centralización o dispersión para variables de razón (ratio o cociente) y de intervalo, de gran utilidad en la estadística descriptiva.

La desviación estándar se basa en la media como punto de referencia y procede a tomar en consideración la magnitud y la ubicación de cada puntuación. Cuán desviado o separado está cada puntuación respecto a la media.

Para conocer con detalle un conjunto de datos, no basta con conocer las medidas de tendencia central, sino que necesitamos conocer también la desviación que representan los datos en su distribución respecto de la media aritmética de dicha distribución, con objeto de tener una visión de los mismos más acorde con la realidad a la hora de describirlos e interpretarlos para la toma de decisiones.

La desviación estándar (σ) mide cuánto se separan los datos.

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$



ANEXO VIII: COEFICIENTE DE VARIACIÓN

Para el cálculo del coeficiente de variación es necesario que: $\bar{x} > 0$

Se calcula:

$$C_V = \frac{\sigma}{\bar{x}}$$

Donde σ es la desviación típica. Se puede dar en porcentaje calculando:

$$C_V = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100$$

Donde:

σ = desviación estándar σ

n = número de mediciones

\bar{x} = media aritmética

x = valor de la variable

cv = coeficiente de variación

En base a información obtenida de las normas de buenas prácticas de laboratorio se ha determinado que el coeficiente de variación máximo permitido para la inyección manual es de 2%, porcentaje que será aplicado para los tiempos de retención (tr).



ANEXO IX: BIBLIOGRAFÍA DE LOS INDICES DE KOVATS REPORTADOS EN LA LITERATURA

- f)** Adams, R.P., Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL., 1995.
- g)** Tellez, M.R., Canel, C., Rimando, A.M., and Duke, S.O. Differential accumulation of isoprenoids in glanded and glandless *Artemisia annua* L. *Phytochem.* 52:1035-1040, 1999.
- h)** Cavalli, J.-F., Tomi, F., Bernardini, A.-F., and Casanova, J., Composition and chemical variability of the bark oil of *Cedrelopsisgrevei* H. Baillon from Madagascar. *FlavourFragr. J.* 18:532-538, 2003.
- i)** Pino, J.A., Mesa, J., Munoz, Y., Marti, M.P., and Marbot, R., Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 53:2213-2223, 2005.
- j)** Choi, H.-S., Character impact odorants of citrus hallabong [(*C. unshiu* Marcov x *C. sinensis* Osbeck) x *C. reticulata* Blanco] cold-pressed peel oil. *J. Agric. Food Chem.* 51:2687-2692, 2003.
- k)** Chung, T.Y., Eiserich, J.P., and Shibamoto, T., Volatile compounds isolated from edible Korean chamchwi (*Aster scaber* Thunb). *J. Agric. Food Chem.* 41:1693-1697, 1993.
- l)** Song, H.S., Sawamura, M., Ito, T., Kawashimo, K., and Ukeda, H., Quantitative determination and characteristic flavour of *Citrus junos* (yuzu) peel oil. *FlavourFragr. J.* 15:245-250, 2000.
- m)** Umamo, R.P., Hagi, Y., and Shibamoto, T., Volatile chemicals identified in extracts from newly hybrid citrus, Dekopon (*Shiranuhi* mandarin Suppl. J.). *J. Agric. Food Chem.* 50:5355-5359, 2002.
- n)** Davies, N.W., Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. *J. Chromatogr. A.* 503:1-24, 1990.
- o)** Szafranek, B., Chrapkowska, K., Ska, M.P., and Szafranek, J., Analysis of leaf surface sesquiterpenes in potato varieties. *J. Agric. Food Chem.* 53:2817-2822, 2005.
- p)** Hognadottir, A., and Rouseff, R.L., Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography - olfactometry and gas chromatography - mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 998:201-211, 2003.