



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO

**Determinación de las propiedades físicas, composición química y
evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de la hoja de
Bixa orellana de la provincia de Zamora Chinchipe**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Romero Bravo, Karen Andrea

DIRECTOR: Valarezo Valdez, Benito Eduardo, Ph.D

LOJA-ECUADOR

2017



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

2017

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D.

Benito Eduardo Valarezo Valdez

DOCENTE DE TITULACIÓN

De mi consideración:

Que el presente trabajo, denominado Determinación de las propiedades físicas, composición química y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de la hoja de Bixa orellana de la provincia de Zamora Chinchipe realizado por el profesional en formación: Karen Andrea Romero Bravo: cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la Graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en el aspecto de forma como de contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes.

Loja, Septiembre del 2017

f).....

DECLARACION DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Karen Andrea Romero Bravo declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Determinación de las propiedades físicas, composición química y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de la hoja de Bixa orellana de la provincia de Zamora Chinchipe, de la titulación de Ingeniería Química, siendo Benito Eduardo Valarezo Valdéz director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

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

f) _____

Autora: Karen Andrea Romero Bravo

Cédula: 0704573518

DEDICATORIA

Con todo mi corazón dedico este trabajo a mi familia, en especial a mis padres PATRICIA y JAMES, que son quienes me han apoyado desde el inicio de mis estudios y que siempre han creído en mí.

Karen Romero

AGRADECIMIENTO

A Dios, gracias a Él que me ha dado la bendición de tener vida y salud, para así poder lograr uno de mis muchos objetivos que me he planteado en mi vida.

A mi madre y a mi padre, por ser mi pilar de apoyo en todos los momentos buenos y malos de mi vida, y sirviéndome siempre como un gran ejemplo de vida.

A mi hermano, por ser una razón más para superarme y darle el mejor ejemplo; y a mis abuelitas por sus oraciones, su cariño, y por siempre creer en mí.

A mi tutor, el PhD. Eduardo Valarezo, por las directrices impartidas y el apoyo brindado para el desarrollo de este trabajo investigativo.

A mi distinguido jurado, conformado por el Mgtr. Jorge Ramirez y el Mgtr. Luis Cartuche; por apoyarme, y por contribuir con sus conocimientos y guías en el desarrollo del presente trabajo.

A mi novio, Diego Paladines, por ser no solo mi novio, sino también mi mejor amigo, mi confidente, mi apoyo en todo momentos, especialmente en los momentos mas duros, por no dejarme sola jamás, por el gran apoyo que me brindaste en la realización de este trabajo y en toda mi carrera, y sobretodo por ser el mejor compañero de vida.

A una de mis mejores amigas y compañera de aventuras, Belén Sotomayor, por su apoyo incondicional, por su colaboración, por compartir tanto conmigo, por ser de las mejores personas que he conocido a lo largo de mi carrera, por su sincera amistad.

A todas las personas, docentes y amigos, que de una u otra manera han contribuido en mi desarrollo profesional y en el de esta investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACION DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I	5
1. MARCO TEÓRICO	5
1.1. Aceites esenciales	6
1.1.1 Extracción	7
1.1.2. Clasificación.	7
1.1.3. Caracterización.	8
1.1.3.1 Cromatografía de gases.....	8
1.1.4. Propiedades.	9
1.1.5. Usos y aplicaciones.	9
1.2. Actividad Biología	10
1.2.1. Actividad antimicrobiana.....	10
1.2.1.1. Bacterias.	10
1.2.1.1.1 Bacterias gram positivas.....	11
1.2.1.1.1.1 <i>Enterococcus faecalis</i>	11
1.2.1.1.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	11
1.2.1.1.1.3 <i>Micrococcus luteus</i>	11
1.2.1.1.2 Bacterias gram negativas.....	11
1.2.1.1.2.1 <i>Escherichia coli</i>	11
1.2.2. Actividad antifúngica.	12

1.2.2.2. Hongos.....	12
1.2.2.2.1 <i>Candida albicans</i>	12
1.2.3 Actividad Antioxidante	12
1.3 Plantas medicinales	12
1.3.1 Flora Ecuatoriana	13
1.3.1.1 Flora aromática del Ecuador.....	13
1.3.2 La Familia <i>Bixaceae</i>	14
1.3.2.1 El género <i>Bixa</i>	14
1.3.2.1.1. <i>Bixa orellana</i>	14
1.3.2.1.1.1. Taxonomía de la especie <i>Bixa orellana</i>	15
CAPITULO II.....	16
2. MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1. Metodología.....	17
2.1.1. Recolección del material vegetal.....	18
2.1.2 Determinación de la humedad de la planta.	18
2.1.3 Extracción del aceite esencial.....	19
2.1.3.1 Determinación del rendimiento.	19
2.1.4 Determinación de las propiedades físicas	19
2.1.4.1 Densidad relativa	19
2.1.4.2. Índice de refracción	19
2.1.4.3. Actividad óptica	20
2.1.5 Determinación de la composición química del aceite esencial.....	20
2.1.5.1 Cromatografía de gases.....	20
2.1.6 Determinación de la actividad antimicrobiana y antifúngica.....	25
2.1.6.1 Actividad Antibacteriana	26
2.1.7 Determinación de la actividad antioxidante	27
2.1.7.1. Análisis de resultados.	29
CAPITULO III.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
3.1 Determinación de humedad de la hoja de <i>Bixa orellana</i>	31
3.2 Rendimiento	31

3.3 Propiedades físicas	32
3.3.1. Densidad relativa	32
3.3.2. Índice de refracción	33
3.3.3. Actividad óptica	33
3.4 Composición química.....	34
3.4.1 Análisis cualitativo y cuantitativo	34
3.5. Actividad biológica.....	42
3.5.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana	42
3.6. Actividad antioxidante.....	43
3.6.1 Método ABTS ⁺	43
3.6.2. Método DPPH.	44
CONCLUSIONES.....	46
RECOMENDACIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXO I	53
DETERMINACIÓN DE HUMEDAD RELATIVA	53
ANEXO II	54
DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO.....	54
ANEXO III	55
DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA A 20°C.....	55
ANEXO IV	57
DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN	57
ANEXO V	59
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ÓPTICA	59
ANEXO VI	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS INDICE DE KOVATS.....	61
ANEXO VII	63
INDICE DE KOVATS	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Muestra botánica de <i>Bixa orellana</i>	15
Figura 2. Esquema de la metodología aplicada.....	17
Figura 3. Ubicación geográfica del lugar de recolección.....	18
Figura 4. Perfil cromatográfico del aceite esencial de <i>Bixa orellana</i> de la columna DB5-MS.....	34
Figura 5. Perfil cromatográfico del aceite esencial de la columna HP-INNOWAX.....	34
Figura 6. Compuestos mayoritarios del aceite esencial según DB5-MS.....	38
Figura 7. Compuestos mayoritarios del aceite esencial según HP-INNOWAX.....	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de operación para la columna DB-5MS.....	21
Tabla 2. Condiciones de operación para la columna HP-INNOWAX.....	22
Tabla 3. Condiciones de operación para la columna DB-5MS con FID.....	23
Tabla 4. Condiciones de operación para la columna HP-INNOWAX con FID.....	24
Tabla 5. Condiciones y medios de cultivo para cada cepa.....	26
Tabla 6. Volumen necesario para cada dilución de Trolox.....	28
Tabla 7. Porcentaje de humedad del material vegetal.....	31
Tabla 8. Rendimiento en porcentaje.....	32
Tabla 9. Densidad relativa del aceite esencial de <i>Bixa orellana</i>	32
Tabla 10. Índice de refracción del aceite esencial de <i>Bixa orellana</i>	33
Tabla 11. Actividad óptica aceite esencial de <i>Bixa orellana</i>	33
Tabla 12. Composición química del aceite esencial de <i>Bixa orellana</i>	36
Tabla 13. Porcentajes relativos de cada uno de los compuestos de CG-EM y CG-FID.....	40
Tabla 14. CMI antibacteriana del aceite esencial de <i>Bixa orellana</i>	42
Tabla 15. Actividad antioxidante según el método ABTS+	43
Tabla 16. Actividad antioxidante según el método DPPH.....	44

RESUMEN

Se recolectó las hojas de la especie *Bixa Orellana* de la provincia de Zamora Chinchipe, en el cantón Yacuambi, en la parroquia La Paz. De esta especie se obtuvo el aceite esencial por el método de destilación por arrastre de vapor, la determinación de la composición química del aceite esencial se realizó mediante cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas CG-EM. Para determinar la actividad antimicrobiana del aceite esencial se aplicó el método de microdilución en caldo y para la actividad antioxidante se emplearon los métodos ABTS⁺ y DPPH. También se determinaron las propiedades físicas del aceite esencial. La composición del aceite esencial consiste principalmente en epi- α -Bisabolol, α -Santalene; nerolidol, α -Bergamotene, β -Farnesene, β -Caryophyllene y β -Santalene, presentó un rendimiento de 0,16%; tiene una densidad de 0,92 g/cm³; índice de refracción de 1,38 y actividad óptica de +12,64°. El aceite esencial presentó actividad antimicrobiana frente a *Micrococcus luteus*, además presentó actividad antioxidante en los dos métodos evaluados, especialmente en ABTS⁺.

PALABRAS CLAVES: *Bixa Orellana*, aceite esencial, destilación por arrastre de vapor, actividad antimicrobiana, actividad antioxidante.

ABSTRACT

The leaves of the species *Bixa Orellana* were collected in the province of Zamora Chinchipe, in the canton Yacuambi, in the parish of La Paz,. From this species the essential oil was obtained by the steam distillation method, the determination of the chemical composition of the essential oil was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry CG-MS. To determine the antimicrobial activity of the essential oil the microdilution method was applied in broth and for the antioxidant activity the methods ABTS + and DPPH were used. The physical properties of the essential oil were also determined. The essential oil composition consists mainly of epi- α -Bisabolol, α -Santalene; nerolidol, α -Bergamotene, β -Farnesene, β -Caryophyllene and β -Santalene, presented a yield of 0.16%; Has a density of 0.92 g/cm³ ; Refractive index of 1.38 and optical activity of +12.64°. The essential oil presented antimicrobial activity against *Micrococcus luteus*, in addition presented antioxidant activity in the two methods evaluated, specifically in ABTS +.

KEY WORDS: *Bixa Orellana*, essential oil, steam distillation, antimicrobial activity, antioxidant activity.

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de investigación se centra en el aceite esencial proveniente de la hoja de la especie *Bixa Orellana*, comúnmente conocida como achiote, perteneciente a la familia *Bixaceae*. En la actualidad esta planta es cultivada extensamente en varias regiones del mundo con fines comerciales u ornamentales. En la medicina tradicional se emplea como droga, principalmente las semillas, pero también se usa las hojas o la corteza. La decocción de las hojas se empleaba como emenagogo, antibiótico, purgativo, diurético, antivenéreo, antiemético, contra la conjuntivitis, quemaduras y como cicatrizante, entre otros usos. Actualmente destaca el uso de esta especie como colorante y condimentador de comidas, como condimento natural es beneficioso para la salud, ya que tiene propiedades digestivas y medicinales, además la infusión realizada con la semilla tiene propiedades insecticidas, por lo que se la puede emplear como repelente contra insectos, en especial contra zancudos (Fonnegra & Jiménez, Plantas medicinales aprobadas en Colombia, 2007).

Este trabajo tiene como objetivo el estudio del aceite esencial de *Bixa Orellana*, mediante la determinación de las propiedades físicas, actividad antioxidante, actividad biológica y composición química. La investigación se desarrolla en tres capítulos: el primero constituye el marco teórico, en el cual se detallan los conceptos claves para la investigación; el segundo capítulo incluye las técnicas empleadas para el desarrollo de esta; y en el tercer capítulo se describen los resultados obtenidos.

En países en vías de desarrollo las plantas medicinales representan el 80% del arsenal terapéutico, mientras que en los países industrializados el 25%, de estas se obtienen extractos o sustancias naturales, los cuales son de gran importancia y utilidad para la industria farmacéutica, alimenticia, cosmética, entre otras. Los problemas de consumir productos sintéticos, como efectos secundarios y la preferencia creciente por parte de los consumidores por productos naturales son razones por la que su estudio es de gran interés, además el desarrollo de nuevos organismos bacterianos y su constante inmunidad a los fármacos actuales hacen que la búsqueda de nuevas opciones medicinales sea una prioridad (Sharapin, 2000).

Las especies vegetales comestibles y aromáticas han suscitado el interés de muchos investigadores a lo largo de la historia. La especie *Bixa Orellana*, corresponde a ambos grupos, por lo que es ampliamente utilizada en la industria alimenticia y médica. Los principales productos de especies aromáticas son los aceites esenciales. Estos son mezclas complejas de sustancias que contienen varias funciones químicas. Hay diversos métodos de

obtención de estos, pero el mas usado es la destilación por arrastre de vapor, ya que es un proceso sencillo, rápido y en donde no intervienen otros compuestos químicos que puedan contaminar el aceite esencial (Sharapin, 2000).

La presente investigación fue desarrollada en la sección de Ingeniería de Procesos del Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja, con la finalidad de contribuir al estudio de la flora aromática de la Región Amazónica del Ecuador.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son extractos naturales que se obtienen de plantas aromáticas. El aroma y el carácter volátil de estos contribuyen en la dispersión de los granos de polen mediante la atracción de insectos polinizadores, además actúan contra posibles predadores como insectos, hongos, herbívoros y microorganismos. Este se puede encontrar en varias partes de la planta; en las hojas, los frutos, las semillas, la raíz y el tallo (Romero M. , 2004).

Los aceites esenciales son mezclas de varios compuestos, incluso pueden ser más de 100 sustancias diferentes, estas se encuentran en diferentes proporciones, y en que en conjunto le otorgan las sus características propias. Los componentes de un aceite esencial son en su mayoría terpenos, estos corresponden del 75% al 90% del peso total del aceite, son compuestos inodoros, es decir, que no son los responsables del aroma, si no que constituyen la base diluyente, que es la que proporciona el carácter volátil, la inflamabilidad y las propiedades físicas como densidad y viscosidad. En menor proporción forman parte del aceite esencial grupos funcionales como: aldehídos, cetonas, ésteres, éteres, alcoholes, etc. Estos compuestos son los responsables del carácter aromático y de las propiedades más importantes de un aceite esencial (Ortuño, 2006).

Se clasifica a los aceites esenciales en base a diferentes criterios. Según la consistencia de las esencias, éstas se dividen en fluidas, bálsamos y oleorresinas. Por su origen, se clasifican como naturales, artificiales y sintéticas, y de acuerdo con la naturaleza de sus componentes mayoritarios se clasifican en aceites tipo monoterpenoides, sesquiterpenoides y compuestos oxigenados (Luna, 2007).

Entre las propiedades más importantes tenemos la actividad antimicrobiana, esta consiste en la inhibición del crecimiento de microorganismos, mediante la acción del aceite esencial como un agente bacteriostático o antifúngico. Otra propiedad destacable es la actividad antioxidante, la cual retrasa o inhibe la oxidación de aceites y lípidos en general (Hirasa & Takemasa, 2002).

Se caracterizan mediante sus propiedades físicas, entre las cuales tenemos: densidad, viscosidad, índice de refracción y actividad óptica. La mayoría de los aceites son menos densos que el agua. El índice de refracción es propio de cada aceite, pero este puede cambiar cuando se lo diluye o se lo mezcla con otras sustancias (Ortuño, 2006).

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, enfleurage y con fluidos supercríticos (Martínez, 2003).

1.1.1 Extracción

Al estar constituidos por compuestos volátiles, los aceites esenciales son fácilmente destilables, aunque también existen otros procesos para la obtención de estos. Entre los principales procesos de extracción tenemos los siguientes: destilación por arrastre de vapor (la cual puede ser con vapor de agua o un gas inerte), prensado, extracción con disolventes derivados del petróleo, extracción con disolventes no derivados del petróleo, extracción por fluidos supercríticos y extracción por microondas (Peredo, Palou, & López, 2009).

La destilación por arrastre de vapor de agua es un método ampliamente utilizado, debido a que es un proceso simple, no requiere equipos complejos, es versátil y económico; con las desventajas de que requiere largos periodos de tiempo para la extracción del aceite, además de que los rendimientos obtenidos por este método son bajos en relación a los obtenidos por otros procesos. En caso de no realizarse correctamente un control de la temperatura, los componentes sensibles al calor podrían descomponerse, dando como resultado un aceite esencial de baja calidad y con un aroma desagradable (Ortuño, 2006).

En este proceso se lleva a cabo la vaporización de los compuestos volátiles de la especie vegetal, es decir, se vaporiza el aceite esencial presente en la planta gracias a la inyección constante de vapor de agua en el destilador. Posteriormente esto se condensa en un refrigerante, de aquí se obtienen dos fases inmiscibles: una acuosa y una orgánica. La fase orgánica corresponde al aceite esencial, el cual es insoluble en agua, lo que permite que finalizado el proceso sea fácilmente separado (Wankat, 1988).

1.1.2. Clasificación.

Los aceites esenciales pueden clasificarse en base a su consistencia, su origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.

En base a su consistencia, encontramos los siguientes:

- Esencias fluidas, líquidos volátiles a temperatura ambiente.
- Bálsamos, líquidos de consistencia más espesa, poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización.
- Oleorresinas, tienen el aroma de las plantas concentrado, son líquidos viscosos o sustancias semisólidas.

En base a su origen, se clasifican en:

- Naturales, son aquellos que se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas.
- Artificiales, se obtienen mediante procesos de enriquecimiento de la esencia.

- Sintéticos, se obtienen de procesos de síntesis química.

En base a su naturaleza química:

- Monoterpenoides, aceites esenciales ricos en monoterpenos.
- Sesquiterpenoides, ricos en sesquiterpenos.
- Fenilpropanoides, ricos en fenilpropanos (Martínez, 2003).

1.1.3. Caracterización.

Entre sus características físicas tenemos las siguientes: volátiles, líquidos a temperatura ambiente, recién destilados son incoloros o ligeramente amarillos, menos densos que el agua con excepciones, casi siempre cuentan con poder rotatorio y un índice de refracción elevado, solubles en alcohol y solventes orgánicos, y son liposolubles (Acevedo, 2013).

Su caracterización química depende de su composición. Los componentes se clasifican en dos grupos: terpenoides y no terpenoides, en estos últimos encontramos sustancias alifáticas de cadena corta, sustancias aromática, sustancias azufradas, y nitrogenadas. Dependiendo de los grupos funcionales que contenga serán sus propiedades químicas, por ejemplo: la presencia de alcoholes indica actividad antimicrobiana, antiséptica, tonificante y espasmolítica. Al ser los componentes de los aceites esenciales compuestos volátiles y de bajo peso molecular (Rivera, 2008).

En la actualidad, los métodos modernos de análisis de la composición de los aceites esenciales están fundamentados en la cromatografía de gases capilar, usando detectores convencionales, principalmente, de ionización en llama (FID) y selectivo de masas (MSD). (Luna, 2007)

1.1.3.1 Cromatografía de gases.

La cromatografía de gases es una técnica analítica de separación que nos permite determinar o caracterizar compuestos volátiles. Esta consta de dos fases, una fase móvil y una fija o estacionaria; la fase móvil es un gas, mientras que la fija puede ser un líquido retenido en un soporte sólido o impregnado en las paredes de una columna capilar (Valcárcel & Gómez, 1988).

Debido a que la composición de los aceites esenciales constituye compuestos volátiles, esta es la técnica que comunmente se emplea para su caracterización química. El equipo empleado se denomina cromatógrafo de gases, esta compuesto por 4 bloques fundamentales: el inyector, que es el sistema para aplicar la muestra; la columna, que es la zona en la que se llevará a cabo la separación de la mezcla; el detector, consiste en un

sistema de detección de analitos eluidos de la columna; y el computador o sistema de recolección de datos (Stashenko, 2009).

El tipo de columna a emplearse es un factor importante, ya que los aceites esenciales se componen de compuestos polares (como alcoholes y aldehídos) y no polares (hidrocarburos terpénicos). Por lo tanto para un correcto análisis es necesario columnas con fases estacionarias de diferente polaridad (Stashenko, 2009).

Para el análisis de aceites esenciales se obtienen del cromatógrafo los tiempos de retención y a partir de estos se determinan los índices de retención también llamados índices de Kovàts, gracias a esto se puede definir cuantos compuestos tiene una mezcla. Los índice de Kovàts de cada compuesto se determina en base a su tiempo de retención, con respecto a los tiempos de retención de dos hidrocarburos lineales, uno que eluye antes y otro que eluye después del compuesto de estudio. Si el análisis se lleva a cabo en condiciones isotérmicas el índice que se determina se llama índice de Kovàts clásico, y si se emplea la programación de un rango de temperatura se conoce como índice de retención lineal o índice de Kovàts modernos (Stashenko, 2009).

1.1.4. Propiedades.

Los aceites esenciales pueden presentar diferentes propiedades terapéuticas, esto en función de su composición. Entre las propiedades de interés tenemos las antisépticas, antioxidantes, antifúngicas, antimicrobianas, organolépticas, entre otras. Un aceite esencial rico en ésteres posee propiedades antiinflamatorias, fungicidas, cicatrizantes, y calmantes. Por otro lado si contiene abundantes compuestos fenoles poseerá gran actividad antibiótica. La característica más importante de los aceites esenciales es que no solo contienen un tipo de grupo funcional, si no, que contienen mezclas de varios de ellos, por la que puede ser muy beneficioso en el ámbito terapéutico (Sanz, 2015).

Gracias a sus propiedades biológicas, los aceites esenciales son usados como bactericidas, insecticidas, fungicidas, antiparasitarios, antiespasmódicos, antiinflamatorios, antiartríticos, además de tener efectos positivos sobre el sistema nervioso central, los aparatos digestivo y respiratorio. En aromaterapia y en aromacología se aducen muchas propiedades curativas a estos aceites, pero éstas han sufrido ciertas dificultades para ser confirmadas (Bandoni, 2000).

1.1.5. Usos y aplicaciones.

El uso de aceites esenciales actualmente está muy extendido, debido a sus diversas propiedades; se destaca su utilidad en la industria de perfumería y cosméticos, lo que se debe principalmente a su aroma; además de que son altamente demandados en la industria

alimenticia como saborizantes y conservantes, en la industria farmacéutica para la elaboración de fármacos y por la medicina tradicional en la aromaterapia. La aplicación de cada uno de los aceites depende fundamentalmente de su composición y de la pureza de este, la cual dependerá del método de extracción del mismo (Maguna, Romero, Garro, & Okulik, 2006).

1.2. Actividad Biología

La actividad biológica de un aceite esencial hace referencia a la actividad antioxidante, antifúngica y al potencial antimicrobiano, la actividad de cada aceite está directamente ligada a su composición estructural. Varios monoterpenos muestran una significativa actividad antiséptica (Marcanno & Masahisa, 2002).

Los componentes de aceites esenciales como el limoneno y derivados hidroxilados han mostrado potencial uso en la quimioterapia del cáncer mamario, además se han reportado varios estudios en donde los aceites esenciales de varias especies, entre ellas la de *Sideritis* sp., y *Lamiaceae*, presentan actividad antimicótica, es decir, contra hongos patógenos para las personas, y en menor grado presentan actividad antimicrobiana (Ezer & Abbasoglu, 1996).

La actividad antimicrobiana se asocia a la presencia de fenoles en el aceite esencial, los fenoles interfieren en el crecimiento microbiano, por privación del sustrato o por la destrucción de la membrana celular. También pueden actuar uniéndose a las adhesinas, lo que forma complejos con la pared celular, causando la inactivación de enzimas o bloqueando la replicación (Adelantado, y otros, 2004).

Generalmente las bacterias grampositivas son más susceptibles al efecto antimicrobiano que las gramnegativas, debido a que en estas no existe una cubierta de lipopolisacáridos que evite la difusión de los compuestos hidrofóbicos presentes en los aceites esenciales (Burt, 2004).

En la presente investigación se evaluará la actividad del aceite esencial frente a bacterias gram positivas (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus luteus*); gram negativas (*Escherichia coli*), y hongos (*Candida albicans*).

1.2.1. Actividad antimicrobiana.

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, consiste en el ataque de estos a las bacterias. El ataque de los antimicrobianos se puede dar de diversas formas; por inhibición de la síntesis de la pared celular, de las funciones de la membrana celular, de la traducción de material genético y de la síntesis de ácidos nucleicos (Manrique & Mosquera, 1997).

1.2.1.1. Bacterias.

Las bacterias son microorganismos, cuyo tamaño va de 2 a 10 μm . Existen diferentes tipos de bacterias, con diferentes metabolismos, el de mayor interés en medicina son las

heterótrofas, que requieren sustratos orgánicos como fuente de energía y de carbono. Las bacterias se clasifican en dos grupos en función de la estructura de su pared: las bacterias grampositivas que poseen solo peptidoglicano; y las gramnegativas que tienen fuera del peptidoglicano una membrana rica en polisacáridos (Prats, 2005).

1.2.1.1.1 Bacterias gram positivas.

Se conoce como bacterias gram positivas a aquellas bacterias que dan como respuesta un color violeta o azul al método de tinción diferencial. Hay un sinnúmero de bacterias de este tipo, entre ellas encontramos las *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Micrococcus luteus* (Macarulla & Goñi, 1994).

1.2.1.1.1.1 Enterococcus faecalis

A este microorganismo se lo relaciona con infecciones endodónticas pos-tratamiento, presenta varios factores de virulencia, como; agregación, capacidad de intercambio de material genético, producción extracelular de superóxido, gelatinasa y citolisinas tóxicas, y capacidad para penetrar dentro de tubos dentarios (Negroni, 2009).

1.2.1.1.1.2 Staphylococcus aureus.

Es una familia de bacterias que se ha vuelto muy frecuente en infecciones hospitalarias, y a su vez se han hecho más resistentes a los fármacos actuales, de aquí la importancia de la búsqueda de nuevas alternativas antimicrobianas (Gutiérrez, 2003).

1.2.1.1.1.3 Micrococcus luteus

Micrococcus luteus es una bacteria presente principalmente en la piel humana, además se la puede encontrar en membranas mucosas, suelo y agua. Se la relaciona con enfermedades como meningitis, artritis séptica, shock séptico, endocarditis, neumonía, entre otras (Monodane, Kawabata, Yang, Hase, & Takada, 2001).

1.2.1.1.2 Bacterias gram negativas

Las bacterias gram negativas poseen una pared celular más delgada que las gram positivas, además presentan una capa externa, la cual consta de un contenido altamente lipídico (García, 2004).

1.2.1.1.2.1 Escherichia coli

La *Escherichia coli* esta comúnmente presente en el intestino de animales de sangre caliente y en el humano, esta es necesaria para la salud, ya que contribuye en la digestión y en la degradación de los alimentos. La presencia de esta bacteria en el agua o en los alimentos es un indicador de que existe contaminación biológica, generalmente por contener heces fecales.

A pesar de ser amigable con la salud, en ocasiones puede causar infección en el tracto urinario o diarrea (Berg, 2004).

1.2.2. Actividad antifúngica.

La actividad antifúngica de aceites esenciales, al igual que la actividad antimicrobiana, consiste en el ataque del aceite en este caso hacia los hongos, o lo que es lo mismo, causa la inhibición del crecimiento de estos microorganismos (Barreto, 1997).

1.2.2.2. Hongos.

Los hongos son una especie bien diferenciada de organismos. La mayor parte de estos no son comestibles, ya que son tóxicos, aunque existe una pequeña proporción que, si pueden ser ingeridos, algunas especies pueden ser levemente venenosas, mientras que otras son letales. Estos se encuentran en diferentes formas y tamaños (Boa, 2005).

1.2.2.2.1 *Candida albicans*

Candida albicans es un hongo dimórfico, que quiere decir que su desarrollo difiere dependiendo de la temperatura. Esta habilidad le permite evadir los mecanismos de defensa celular. Puede desarrollarse como levadura o como hongo, como este último se comporta como un parásito patógeno afectando al huésped (INSHT, 2012).

1.2.3 Actividad Antioxidante

Un agente antioxidante es aquel que es capaz de frenar las reacciones de oxidación en las células, a partir de las cuales se originan los nocivos radicales libres. Por tanto, su papel es clave en la reducción de enfermedades cardiovasculares, de tumores y de enfermedades neurodegenerativas. También actúan potenciando el sistema inmunológico (Vilaplana, 2007).

Hay un interés creciente en el uso de nuevos extractos naturales antioxidantes para sustituir los aditivos sintéticos que se emplean en los alimentos, ya que esto es una alternativa para la prevención y el tratamiento de enfermedades producidas por estos aditivos sintéticos. Muchos autores han reportado propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes y antiradicalarias de diferentes aceites esenciales y en algunos casos, una aplicación directamente relacionada con los alimentos. Dada la complejidad química de los aceites esenciales, la prueba de actividad antioxidante puede arrojar resultados diferentes dependiendo del método empleado (Acevedo, 2013).

1.3 Plantas medicinales

Son aquellas vegetales que elaboran unos productos llamados principios activos, que son sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre el

organismo vivo. Su utilidad primordial a veces específica, es servir como droga o medicamento que alivie la enfermedad o restablezca la salud perdida; es decir, que tienden a disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico que es la enfermedad (Muñoz, 2002).

La gran diversidad de la flora ecuatoriana ha sido reconocida y estudiada desde hace mucho tiempo, la flora de este país ha sido desde siempre reconocida por ser inmensamente rica en plantas útiles; especialmente de uso en la medicina tradicional y que pueden y han sido empleadas en la medicina moderna (Balslev, Navarrete, de la Torre, & Macía, 2008).

1.3.1 Flora Ecuatoriana

La flora ecuatoriana representa un alto porcentaje de la biodiversidad mundial. El Ecuador con apenas 256.370 km², ocupa tan solo 0,19% de la superficie terrestre pero alberga el 6,4% de las plantas del mundo. Por su parte la flora ecuatoriana es inmensamente rica. Se han hecho estimaciones de que existen alrededor de 25000 especies de plantas vasculares. Hasta la presente fecha, de las cuales 4.173 especies son endémicas, es decir no se encuentran naturalmente fuera del país (Estrella, 2005).

A pesar de esta importancia mundial y regional, en el Ecuador existe una alta tasa de pérdida de la biodiversidad biológica debido principalmente a la destrucción de los bosques, causada por la invasión a las áreas naturales, conversión de los bosques a pastos o cultivos, inseguridad en la tenencia de la tierra, etc. Se estima que la tasa de deforestación alcanza un 2.3%, equivalente a la pérdida de 3.400 kilómetros cuadrados de bosques por año (Acosta, 1992).

En nuestro país existen plantas medicinales que pueden tomarse directamente, consumiéndolas como un alimento más, y no precisan de ninguna preparación especial. Otras plantas son hierbas que pueden mezclarse con los alimentos, aportándoles su peculiar sabor y dándoles, al mismo tiempo, sus propiedades medicinales. Dentro de éstas tendríamos hierbas aromáticas como, por ejemplo, el romero, la menta, el orégano, entre otras muchas más (Cuenca, 2013).

1.3.1.1 Flora aromática del Ecuador.

El Ecuador es un país megadiverso en relación a especies vegetales, a pesar de que no existe un registro oficial de cuantas de las especies presentes en el país son aromáticas, se puede estimar que son muchas. Algunas de estas son cultivadas en huertos caseros, mientras que otras crecen en bosques de manera silvestre (Cerón & Reina, 1996).

El sector de plantas medicinales, aromáticas y derivados en el Ecuador viene presentando un crecimiento sostenido con muchas posibilidades de desarrollar productos para la exportación,

siendo sus principales mercados el alimenticio, el farmacéutico y el cosmético. La producción de hierbas aromáticas y medicinales, se encuentra presente en diversas regiones del territorio nacional, esta dispersión hace que cada especie cuente con las características propias de la zona en la que es cultivada, motivado ello por las condiciones edáficas, climáticas y culturales propias de cada región. Actualmente el cultivo de hierbas aromáticas y medicinales en gran parte es comunitaria y se ha convertido en un importante componente del ingreso de pequeños y medianos productores rurales, especialmente de mujeres con conocimientos ancestrales sobre plantas aromáticas y medicinales (Marcia, 2011).

Dentro del grupo de especies tanto medicinales como aromáticas, encontramos a la familia *Bixaceae*, específicamente el centro de este estudio la especie *Bixa Orellana*, gracias a pertenecer a ambos grupos es ampliamente utilizada en la industria alimenticia y médica, además que atrae el interés de muchos (Sharapin, 2000).

1.3.2 La Familia *Bixaceae*

La familia *Bixaceae* se compone de árboles o arbustos que van desde los 2 a 10 m de altura, los cuales producen un exudado de color naranja. Sus hojas son alternas y palmatinervias. Sus flores constan de 5 sépalos y 5 pétalos imbricados, los cuales pueden ser de color blanco o rosado. Sus frutos es de forma capsular y espinoso. Y sus semillas son lisas y carnosas. Esta familia comprende un único género, el género *Bixa*, con 5 especies distribuidas por tierras bajas del neotrópico (Vargas, 2002).

1.3.2.1 El género *Bixa*

Bixa es un género monoespecífico, se lo encuentra distribuido por el continente americano, la zona central y sur, especialmente en zonas tropicales. Este género comprende 5 especies, una cultivada, mientras que las otras son silvestres. La especie mas común de este género es la *Bixa orellana* (León, 2000).

1.3.2.1.1. *Bixa orellana*

Bixa Orellana es una especie de la familia *Bixaceae*, es comúnmente conocida con el nombre de achiote, onoto o urucu. El nombre del género *Bixa* proviene de bija, este fue dado por los indígenas de las Antillas, mientras que el épiteto orellana se debe al conquistador Francisco de Orellana, el nombre común achiote fue dado por los indígenas de México (Fonnegra & Jiménez, Plantas medicinales aprobadas en Colombia, 2007).

Esta planta es originaria de América Tropical, aunque en la actualidad se ha extendido su cultivo en todas las regiones tropicales del mundo, desde el nivel del mar hasta 1800 m s.n.m., esta especie puede ser cultivada en jardines, huertos, patios, etc.; generalmente con fines comerciales (Fonnegra & Jiménez, Plantas medicinales aprobadas en Colombia, 2007).

Es considerada un insecticida natural, y presenta ventajas como su rápido crecimiento y una vida media de larga duración (Cárdenas, Arias, & López, 2004). En el aceite de las hojas se han identificado mono y sesquiterpenos, mientras que la decocción de las hojas se ha demostrado que provoca actividad uterotónica en dosis de 500 a 1000 mg/Kg de peso de la persona, mientras que por vía intraperitoneal en estudios realizados en ratas ha ocasionado disminución de la actividad motriz y aumento en la diuresis, sin mostrar signos de toxicidad (Fonnegra & Jiménez, Plantas medicinales aprobadas en Colombia, 1999).

1.3.2.1.1.1. Taxonomía de la especie *Bixa orellana*

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Malvales
- Familia: Bixaceae
- Género: Bixa
- Especie: Bixa orellana L.

La figura 1 es una muestra botánica de la especie *Bixa orellana*.



Figura 1. Muestra botánica de *Bixa orellana*

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

CAPITULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Metodología

El presente trabajo investigativo se llevó a cabo en la sección de Ingeniería de Procesos del Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja. La metodología empleada se describe en la figura 2.



Figura 2. Esquema de la metodología aplicada.

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

2.1.1. Recolección del material vegetal.

La recolección de las hojas de la especie *Bixa Orellana* L. fue realizada en la parroquia La Paz, en el cantón Yacuambi, provincia de Zamora Chinchipe, ubicada en la zona Sur del Ecuador en la región Amazónica. La ubicación geográfica donde se recolectó la especie tiene las siguientes coordenadas: latitud 170732458E, longitud 9582197N y altura 886 m s.n.m. En la figura 3 se muestra la localización del lugar de recolección.

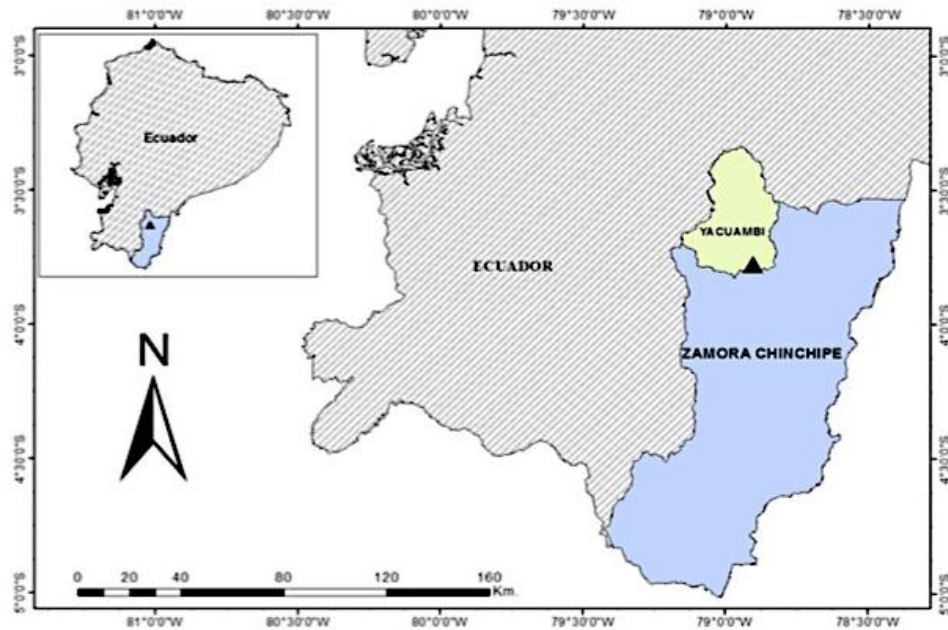


Figura 3. Ubicación geográfica del lugar de recolección.

Fuente: Benítez, 2016

Elaboración: Benítez, 2016

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

La especie fue recolectada en estado de fructificación en los meses de diciembre y enero, a horas de la mañana, comprendidas entre las 6 y las 8 am., en días nublados. Se realizó tres recolecciones distintas con un intervalo de 15 días entre cada una. Posteriormente a cada recolección se realizó un tratamiento post cosecha, se eliminó las impurezas presentes y el material vegetal en malas condiciones.

2.1.2 Determinación de la humedad de la planta.

Para determinar el porcentaje de humedad de la muestra vegetal, se tomó tres muestras de material fresco dividido en pequeños pedazos, cada una contuvo aproximadamente 1 gramo. Estas muestras se colocaron en una lámpara ULTRA X a 30°C por varios periodos cortos de 15 a 30 minutos, tras cada periodo se peso cada muestra hasta que este se mantuvo constante, es decir, hasta eliminar toda la humedad presente en el material vegetal.

Finalmente se calculó el porcentaje de humedad presente en cada una de las muestras (ver Anexo I).

2.1.3 Extracción del aceite esencial.

La extracción del aceite esencial de las hojas se llevó a cabo a través de destilación por arrastre de vapor, en un destilador tipo cleverger. El cual consiste en un tanque de acero inoxidable, en su interior tiene una base falsa agujereada, bajo esta se agregó agua, mientras que sobre la base se colocó el material vegetal; la tapa del tanque es de forma cónica con un tubo de salida que se conecta a un refrigerante o condensador, acoplado a un florentino, en este se recolectó el aceite esencial extraído. El destilador se calentó por medio de fuego. El proceso duró aproximadamente 5 horas, al finalizar se recolectó y envasó el aceite esencial obtenido en frascos ámbar, se identificó a cada muestra con un código, y se almacenaron a -4°C.

2.1.3.1 Determinación del rendimiento.

El rendimiento se determinó para cada una de las destilaciones, el cálculo de este relaciona la cantidad de material vegetal utilizada en peso, con el volumen de aceite esencial obtenido (Ver anexo II). La ecuación es la siguiente:

$$\%R = \frac{Volumen\ (ml)}{Peso\ (gr)} * 100$$

2.1.4 Determinación de las propiedades físicas

Se determinó la densidad relativa, el índice de refracción y la actividad óptica del aceite esencial de la hoja de *Bixa orellana*.

2.1.4.1 Densidad relativa

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

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

2.1.4.2. Índice de refracción

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

Para este ensayo se colocó una gota de aceite esencial en el equipo y se procedió a la respectiva lectura. Se obtuvo un valor medio a partir de las muestras obtenidas de las mezclas de los tres aceites de cada recolección.

2.1.4.3. Actividad óptica

La actividad óptica se determinó en base a la norma ISO 592-1998, se empleó un polarímetro digital, modelo Mrc-Automatic Polarimeter P81, en el cual se definió la capacidad del aceite para desviar la luz polarizada (ver anexo V).

Este procedimiento se realizó para las tres muestras de aceite de cada recolección y se determinó un valor promedio.

2.1.5 Determinación de la composición química del aceite esencial

La determinación de la composición química del aceite esencial de *Bixa orellana* se realizó mediante la técnica conocida como cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM).

2.1.5.1 Cromatografía de gases

La composición química del aceite esencial se determinó mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), y al detector de ionización de llama FID (CG-FID). Cada una de las corridas cromatográficas se realizaron en dos columnas, una no polar (DB-5MS) y una polar (HP-Innowax). El tamaño de las columnas fue de 30m x 0,25mm x 0,25µm. La columna no polar está recubierta internamente de 5%-Fenil-metilpolisiloxano y la columna polar tiene un recubrimiento interno de polietilenglicol.

La preparación de las muestras consistió en colocar en un vial de 2 ml, 990µL de diclorometano y 10µL del aceite esencial, es decir, se preparó a una dilución del 1% de aceite.

Como compuestos de referencia se inyectaron hidrocarburos (C10-decano a C25-pentacosano) conocidos comercialmente como TPH-6RPM de CHEM SERVICE, estos fueron inyectados en ambas columnas y en las mismas condiciones que las muestras de aceites esenciales. El tiempo de retención de estos compuestos fueron la base para la identificación de cada uno de los compuestos mediante sus índices de Kovàts.

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

Las condiciones de operación de la corrida cromatográfica en la columna no polar DB-5MS, , se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de operación para la corrida en columna DB-5MS.

Equipo	Condiciones de operación	
Horno	Temperatura inicial	50°C
	Tiempo inicial	3 min
	Rampa	3°C/min
	Temperatura final	230°C
Sistemas de inyección	Modo	Split
	Radio de partición	50:1
	Temperatura inicial:	250°C
	Gas	Helio
	Volumen de inyección	1 μ L
Columna	Tipo	DB-5MS
	Temperatura máxima	350°C
	Modo	flujo constante
	Flujo inicial	0,9 mL/min
	Presión inicial nominal	6,50 psi
	Presión de salida	vacío
	Velocidad promedio	35 cm/s
Detector	Temperatura	250°C
	Gas	Nitrógeno

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

2.1.5.1.3 Corrida cromatografía en la columna HP-INNOWAX acoplada a espectrometría de masas.

Las condiciones de operación de la corrida cromatográfica en la columna polar HP-INNOWAX se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de operación para la corrida en columna HP-INNOWAX.

Equipo	Condiciones de operación	
Horno	Temperatura inicial	50°C
	Tiempo inicial	3 min
	Rampa	3°C/min
	Temperatura final	230°C
Sistemas de inyección	Modo	Split
	Radio de partición	50:1
	Temperatura inicial:	250°C
	Gas	Helio
	Volumen de inyección	1 μ L
Columna	Tipo	HP-INNOWAX
	Temperatura máxima	270°C
	Modo	flujo constante
	Flujo inicial	0,9 mL/min
	Presión inicial nominal	6,49 psi
	Presión de salida	vacío
	Velocidad promedio	35 cm/s
Detector	Temperatura	250°C
	Gas	Nitrógeno

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

2.1.5.1.4 Corrida cromatografía en la columna DB-5MS acoplada al detector de ionización en llama.

Las condiciones de operación de la corrida cromatográfica en la columna DB-5MS acoplada al detector de ionización de llama (FID) se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de operación para la corrida en columna DB-5MS con FID.

Equipo	Condiciones de operación	
Horno	Temperatura inicial	50°C
	Tiempo inicial	3 min
	Rampa	3°C/min
	Temperatura final	230°C
Sistemas de inyección	Modo	Split
	Radio de partición	50:1
	Temperatura inicial:	250°C
	Gas	Helio
	Volumen de inyección	1 μ L
Columna	Tipo	DB-5MS
	Temperatura máxima	350°C
	Modo	flujo constante
	Flujo inicial	0,9 mL/min
	Presión inicial nominal	10,82 psi
	Presión de salida	ambiente
	Velocidad promedio	23 cm/s
Detector (Ionización de llama)	Tipo de llama	aire-hidrógeno
	Temperatura	250°C
	Gas	Nitrógeno

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

2.1.5.1.5 Corrida cromatografía en la columna HP-INNOWAX acoplada al detector de ionización en llama.

Las condiciones de operación de la corrida cromatográfica en la columna HP-INNOWAX acoplada al detector de ionización de llama (FID) se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de operación para la corrida en columna HP-INNOWAX con FID.

Equipo	Condiciones de operación	
Horno	Temperatura inicial	50°C
	Tiempo inicial	3 min
	Rampa	3°C/min
	Temperatura final	230°C
Sistemas de inyección	Modo	Split
	Radio de partición	50:1
	Temperatura inicial:	250°C
	Gas	Helio
	Volumen de inyección	1 μ L
Columna	Tipo	HP-INNOWAX
	Temperatura máxima	270°C
	Modo	flujo constante
	Flujo inicial	0,9 mL/min
	Presión inicial nominal	11,37 psi
	Presión de salida	ambiente
	Velocidad promedio	24 cm/s
Detector (Ionización de llama)	Tipo de llama	aire-hidrógeno
	Temperatura	250°C
	Gas	Nitrógeno

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

2.1.5.1.6 identificación de los compuestos químicos

Los resultados obtenidos de las corridas cromatográficas son integrados mediante un software (Chemstation Integrator-autoint1.e), para así adquirir los datos con los compuestos a identificar. Para la identificación de los compuestos, se determinaron los índices de Kovàts de cada uno de los picos detectados según lo descrito en el anexo VI (Ver anexo VI).

La identificación de los compuestos se desarrolló partiendo de los índices de Kovàts calculados y comparandolos con índices de Kovàts de referencia, los cuales fueron tomados de Adams (2009), bases de datos electrónicas como Nist (National Institute of Standards and Technology), además de artículos científicos de alta relevancia; de modo que la diferencia entre el IK calculado y el leído no supere 30 unidades. Asimismo se tomó en cuenta el CAS de cada compuesto para facilitar su identificación.

Los datos de hidrocarburos obtenidos en masas y en FID se utilizaron para calcular una ecuación de la recta con la cual se calcula los tiempos de retención de cada compuesto. Estos tiempos de retención calculados se comparan con los tiempos de retención detectados de cada muestra; los tiempos de retención se van ajustando a los compuestos encontrados en cada columna, polar y no polar.

2.1.6 Determinación de la actividad antimicrobiana y antifúngica.

Para la determinación de la actividad biológica del aceite esencial de *Bixa orellana*, se utilizó el método de microdilución en caldo frente a diferentes cepas bacterianas, este método evalúa la capacidad mínima inhibitoria antibacteriana (CMI). Las cepas bacterianas empleadas para determinar la actividad biológica del aceite esencial fueron las siguientes:

Bacterias Gram-negativas:

- *Escherichia coli* 43888 ATCC

Bacterias Gram-positivas:

- *Enterococcus faecalis* 19433 ATCC
- *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC
- *Micrococcus luteus* 1040 ATCC

Hongo levaduriforme:

- *Candida albicans* 10231 ATCC

2.1.6.1 Actividad Antibacteriana

El análisis de la actividad antibacteriana se realizó por el método de microdilución en caldo y la determinación de la CMI. Este método consiste en emplear diferentes volúmenes muy pequeños de la muestra a analizar, para esto se utiliza una microplaca de 96 pocillos, en cada uno de estos se llevan a cabo diluciones seriadas.

El primer paso es la preparación de la muestra, esta debe ser diluida, es decir, se debe colocar en un vial 20 μL de aceite esencial y adicionarle 980 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). Esta dilución se aplica tanto para bacterias como para hongos.

Tras la preparación de la muestra se prepara el cultivo "Overnight". Inicialmente deben prepararse los caldos de cultivo específico para cada cepa microbiana, seguido se prepara la siembra con 30 μL de cada cepa bacteriana. Tras la siembra se incuban los medios durante 14 a 16 horas a la temperatura óptima de crecimiento.

Las condiciones y medios de cultivo necesarios para el desarrollo de cada cepa se describen en la tabla 5:

Tabla 5. Condiciones y medios de cultivo para cada cepa.

Cepa	Medio de cultivo	Temperatura	Tiempo
<i>Escherichia coli</i>	Caldo triptisoya	37°C	14-16 horas
<i>Enterococcus faecalis</i>	Caldo infusión cerebro-corazón	37°C	14-16 horas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo triptisoya	37°C	14-16 horas
<i>Micrococcus luteus</i>	Caldo nutritivo	35°C	14-16 horas
<i>Candida albicans</i>	Caldo sabouraud	35°C	14-16 horas

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

A continuación se prepara la suspensión del inóculo bacteriano, este consiste en preparar una suspensión, para esto se debe tomar 150-300 μL del cultivo overnight y colocarlos en un tubo junto con 7ml de suero fisiológico estéril, y ajustar el inóculo a una concentración equivalentede 0,5 en la escala de Mc Farland. De la solución anterior se toman 140 μL y se inoculan en 6,86 ml de caldo Mueller Hinton, ajustando la población a 2×10^6 ufc/mL. Finalmente se pasan 100 μL a la placa de cultivo, obteniendo un volumen final de 200 μL .

Posteriormente se realiza el análisis del aceite, este se realizó en una cabina de seguridad, previamente limpia y esterilizada para evitar contaminaciones. La prueba se realizó en microplacas de 96 pocillos empleando el procedimiento de dilución doble seriada: del caldo

Mueller Hinton se transfirió 180µL a cada pocillo de la primera fila, y 100µL a los pocillos restantes, luego se adicionaron 20µL de la solución de aceite diluido a cada pocillo de la primera fila excepto a los tres últimos pocillos, los cuales contendrán: 1) como control de esterilidad (200 µL de caldo Mueller Hinton o Sabourad). 2) control negativo (180 µL caldo Muller Hinton/Sabourad + 20 µL DMSO) y 3) como control positivo (gentamicina en una solución de 1 mg/ml para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli* y *Micrococcus Luteus*; tetraciclina 5mg/ml para *Enterococcus faecalis*; e itraconazol 1mg/ml para *Candida albicans*.

Para lograr una homogenización correcta del medio y la solución de aceite, se pipeteó de 15 a 20 veces la solución, de todos los pocillos de la primera fila del cual se tomaron 100µL de la solución homogénea y se diluyeron con 100µL del pocillo siguiente, se mezcló y se continuó este procedimiento hasta obtener 8 diluciones consecutivas; en la última fila de la placa se excluyeron los 100µL sobrantes. El mismo procedimiento fue aplicado para el control positivo, negativo y de esterilidad.

Finalmente ya preparada la placa de microdilución, se inoculó con 100 µL de la suspensión del inóculo bacteriano en todos los pocillos, excepto en los pocillos en los que se coloca los controles de esterilidad, control positivo y negativo; completando así un volumen final de 200 µL, ajustando la población bacteriana a 5×10^5 ufc/mL. Al concluir la inoculación, las placas se sellaron con parafilm y fueron incubadas a 37 °C de 18-24 h.

Una vez retiradas las placas de microdilución de la incubadora, se examinó detalladamente cada caja utilizando luz reflejada, empezando por el control de esterilidad para descartar cualquier tipo de contaminación, en caso de que la placa se muestre contaminada, la prueba no puede ser interpretada y debe ser repetida.

2.1.7 Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante del aceite esencial de *Bixa Orellana* se evaluó mediante el empleo de dos métodos efectuados en microplacas; el método DPPH que se realizó en base a la técnica de Brand-Williams con modificaciones de Thaipong. Mientras que el método ABTS se basó en la técnica de Arnao, de igual manera, con ajustes de Thaipong. Ambos métodos son espectrofotométricos y se basan en la capacidad de captar el catión radical ABTS⁺ y del radical libre DPPH.

Inicialmente se preparó una solución estándar de TROLOX, el cual es un patron de referencia, empleado para expresar la actividad antioxidante del aceite esencial como TEAC que es la capacidad antioxidante equivalente a Trolox. La solución estándar de TROLOX fue de 1000µM y se utilizó en ambos métodos.

En la tabla 6 se muestran las concentraciones, correspondientes a la preparación del estandar de TROLOX. Cabe mencionar que cada estándar tendrá un volumen final de 1 mL.

Tabla 6. Volumen necesario para cada dilución de Trolox.

Estándar:	Solución patrón (μL)	MeOH (μL)	Concentración final (μM)	Concentración final en el ensayo (μM)
1	25	975	25	2,5
2	50	950	5	5
3	100	900	10	10
4	200	800	20	20
5	300	700	30	30
6	400	600	40	40
7	500	500	50	50

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

La estandarización de ambos métodos fue realizado en el laboratorio de Bioensayos del departamento de química y ciencias exactas. En donde, en base a los estándares preparados anteriormente, realizaron dos curvas de calibración, una para cada uno de los métodos ensayados, de cada curva obtuvieron una ecuación y su coeficiente de determinación de Pearson, la “y” representa la absorbancia leída de cada uno de los estándares de Trolox mencionados anteriormente, mientras que “x” representa la concentración en μM equivalentes de Trolox, las ecuaciones y sus coeficientes de determinación de Pearson obtenidos son descritos a continuación.

Ecuación ABTS⁺:

$$y = -0,0177x + 1,0936$$

$$R^2 = 0,9974$$

Ecuación DPPH:

$$y = -0,0226x + 1,0482$$

$$R^2 = 0,9969$$

Una vez obtenidas las curvas de calibración, se procedió a preparar la solución madre de ABTS, esta se preparó con 7,4mM de reactivo ABTS⁺ y 2,6 mM de persulfato de potasio (K₂S₂O₈), ambos se mezclaron y se dejaron reaccionar por 16 horas a temperatura ambiente protegidos de la luz. Transcurrido este tiempo se preparó una solución de trabajo con una alícuota de la solución patrón y metanol, esta se ajustó hasta obtener a 734nm una absorbancia de $1,1 \pm 0,02$.

A continuación realizamos el análisis de la actividad antioxidante con el método DPPH. La solución madre de DPPH se preparó con 0,625 mM del reactivo con el mismo nombre, de igual manera que en el método ABTS⁺, a la solución de trabajo se le midió la absorbancia a una longitud de onda de 515nm ajustándose hasta obtener una lectura de $1,1 \pm 0,02$.

Se prepararon diversas diluciones de aceite esencial de *Bixa Orellana* y se colocaron pequeñas alícuotas de estas junto con la solución de trabajo en una microplaca, primero se llevó a cabo el método ABTS⁺ y después DPPH. Una vez preparadas las muestras en la microplaca, a esta se la introduce en el equipo EPOCH2, el cual es un lector de microplacas, este lee constantemente la absorbancia de cada uno de los pocillos de la microplaca. Este procedimiento se repitió varias ocasiones hasta obtener que la absorbancia de las muestras se encuentre dentro de las de la curva de calibración. La lectura de las muestras se realizaron a 734nm para el método ABTS⁺ y a 515nm para DPPH, cabe recalcar que cada una de las muestras se analizó por triplicado.

2.1.7.1. Análisis de resultados.

Finalmente, la determinación de la capacidad antioxidante del aceite esencial de *Bixa orellana* se realizó en base a la absorbancia obtenida de las muestras tratadas con el aceite esencial. Este valor de la absorbancia fue reemplazado en la ecuación de la curva de calibrado y se despejó “x” para hallar las μM equivalentes de Trolox contenidas en un gramo de aceite esencial. Este valor también se expresó como μM equivalentes de Trolox por gramo de base fresca, es decir, por gramo de material vegetal fresco; para determinar este último se empleó el rendimiento del aceite esencial.

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación de humedad de la hoja de *Bixa orellana*

En la tabla 7 se muestran los valores en porcentaje de humedad del material vegetal correspondientes a cada una de las 3 recolecciones realizadas; además se incluye la media y la desviación estándar.

Tabla 7. Porcentaje de humedad del material vegetal.

Tabla 7.1: Grupos de humedad del material vegetal.			
Recolección	Humedad (%)	$\bar{X}$	σ
BO1	60,62	64,60	3,61
BO2	65,50		
BO3	67,67		
BO1: Primera recolección. BO2: Segunda recolección. BO3: Tercera recolección. $\bar{X}$: Promedio de las tres recolecciones. σ : Desviación estándar.			

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

El material vegetal fresco contiene una cantidad importante de agua, el cual se refleja en el porcentaje de humedad, las hojas según su textura pueden tener de 60% a 90% de humedad; en la tercera recolección es en donde se obtuvo el mayor valor de la humedad, mientras que la primera recolección fue la de una humedad menor; por lo que los valores obtenidos se encuentran dentro del rango descrito en la bibliografía. (Muñoz, 2002)

La cantidad de agua presente en las plantas depende de las condiciones ambientales a las que se somete, como humedad del aire, temperatura y clima, así como también de la humedad del suelo y del desarrollo de la misma.

Por lo tanto, la variación del porcentaje de humedad entre cada una de las recolecciones, puede deberse a los cambios en las condiciones climáticas, ya que cada recolección se realizó con una diferencia de 15 días y en una zona con variabilidad climática (Ordoñez, 2016).

3.2 Rendimiento

En la tabla 8 se muestran los valores correspondientes al rendimiento expresado en porcentaje, obtenido en cada una de las recolecciones; además se incluye la media y la desviación estándar.

Tabla 8. Rendimiento en porcentaje.

Tabla 8. Rendimiento en porcentaje.			
Recolección	Rendimiento (%)	$\bar{X}$	σ
BO1	0,161	0,161	0,001
BO2	0,162		
BO3	0,159		
BO1: Primera recolección. BO2: Segunda recolección. BO3: Tercera recolección. $\bar{X}$: Promedio de las tres recolecciones. σ : Desviación estándar.			

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

Generalmente las plantas aromáticas tienen rendimientos que van desde 0,01% a 10,%, el rendimiento medio de la mayoría es alrededor de 1 a 2%. Por lo tanto, el rendimiento obtenido es considerado bajo (Bandoni, 2000).

Giwa-Ajeniya et. al. (2016) reporta un rendimiento de 0,21% para el aceite esencial obtenido de la hoja de *Bixa orellana*, este es ligeramente mas alto que el obtenido en esta investigación, esto puede deberse a que las hojas empleadas en las investigaciones pudieron desarrollarse bajo diferentes condiciones.

3.3 Propiedades físicas

Las propiedades físicas determinadas del aceite esencial de la hoja de *Bixa Orellana* son: la densidad relativa, índice de refracción y actividad óptica.

3.3.1. Densidad relativa

En la tabla 9 se muestran los valores obtenidos correspondientes a la densidad relativa de cada una de las recolecciones realizadas, la media y la desviación estándar.

Tabla 9. Densidad relativa del aceite esencial de *Bixa orellana*.

Recolección	Densidad (g/cm ³)	$\bar{X}$	σ
BO1	0,9217	0,9232	0,0013
BO2	0,9239		
BO3	0,9240		
BO1: Primera recolección. BO2: Segunda recolección. BO3: Tercera recolección. $\bar{X}$: Promedio de las tres recolecciones. σ : Desviación estándar.			

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

La densidad media del aceite esencial de *Bixa Orellana* es menor a 1 g/cm³, por lo tanto es un aceite menos denso que el agua. Según Costa-Batlloorí (2003) los aceites esenciales tienen

una densidad que va de 0,84 a 1,18 g/cm³, esto depende de la especie y del lugar de origen, Por lo tanto, la densidad del aceite esta dentro de los valores mencionados.

3.3.2. Índice de refracción

En la tabla 10 se expresan los resultados correspondientes al índice de refracción determinado para cada una de las recolecciones, la media y la desviación estándar.

Tabla 10. Índice de refracción del aceite esencial de *Bixa Orellana*.

Recolección	Índice de refracción	$\bar{X}$	σ
BO1	1,3811	1,3799	0,0011
BO2	1,3790		
BO3	1,3795		
BO1: Primera recolección. BO2: Segunda recolección. BO3: Tercera recolección. $\bar{X}$: Promedio de las tres recolecciones. σ : Desviación estándar.			

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

En su gran mayoría las esencias vegetales muestran índices de refracción entre 1,40 y 1,61 a 20 °C (Murillo, Fernández, & Sierra, 2004). Por lo tanto, en índice de refracción se encuentra dentro del rango establecido. El valor del índice de refracción del aceite de *Bixa orellana* no se ha reportado anteriormente en bibliografía alguna, por lo que no es posible compararlo.

3.3.3. Actividad óptica

En la tabla 11 se presentan los resultados de la actividad óptica del aceite, correspondiente a cada una de las recolecciones, la media y la desviación estándar.

Tabla 11. Actividad óptica aceite esencial de *Bixa Orellana*.

Recolección	Actividad óptica	$\bar{X}$	σ
BO1	+12,64°	+12,64°	0,01
BO2	+12,63°		
BO3	+12,64°		
BO1: Primera recolección. BO2: Segunda recolección. BO3: Tercera recolección. $\bar{X}$: Promedio de las tres recolecciones. σ : Desviación estándar.			

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

Una sustancia es ópticamente activa cuando causa un giro en el plano de la luz polarizada, por lo tanto, ya que el aceite causó un giro de +12,64° es ópticamente activo (Atkins & Jones, 2006). El ángulo de rotación de la luz polarizada causado por la acción del aceite es positivo, es decir, que rota en el mismo sentido de las manecillas del reloj, lo que significa que la

mayoría de los compuestos que forman el aceite esencial son sustancias dextrorrotatorias. La medición de la actividad óptica sirve como referencia de pureza de las sustancias, ya que esta se da en función de su composición química, por lo tanto, el aceite esencial analizado se considera puro (Gennaro, 2003). Hasta el momento no se encuentran reportes que indiquen la actividad óptica del aceite esencial de *Bixa Orellana* por lo que no es posible compararlo.

3.4 Composición química

3.4.1 Análisis cualitativo y cuantitativo

La figura 4 corresponde al perfil cromatográfico del aceite esencial de *Bixa orellana* obtenido de la columna no polar DB5-MS, mientras que la figura 5 corresponde al perfil obtenido en la columna HP-INNOWAX.

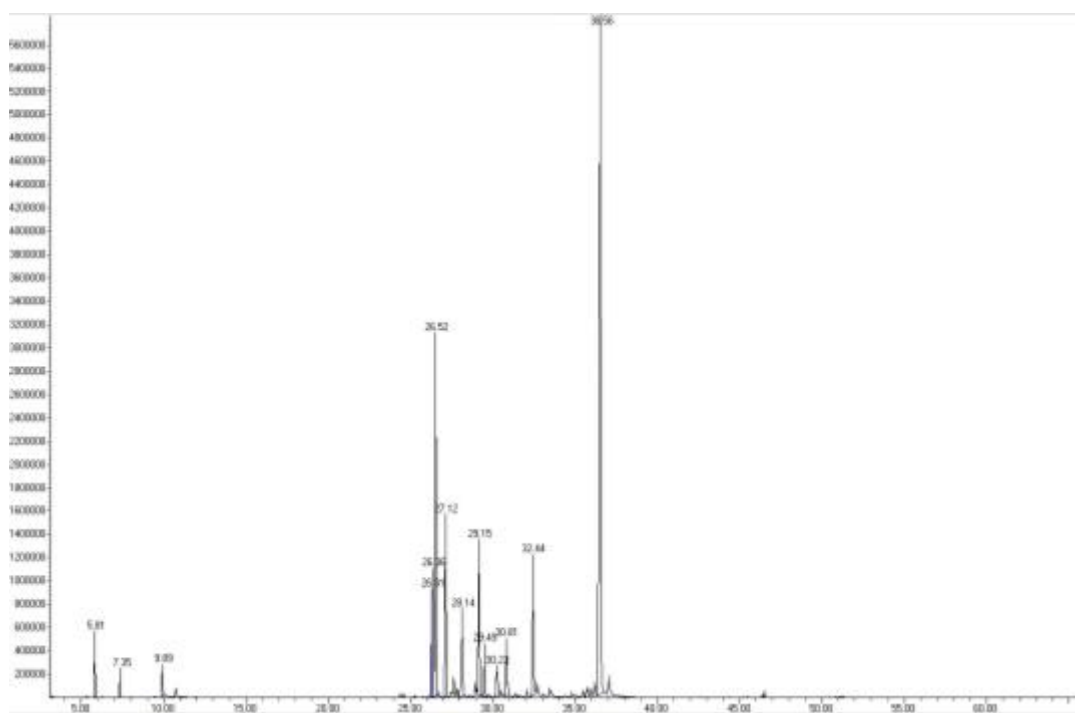


Figura 4. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *Bixa orellana* de la columna DB5-MS.

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

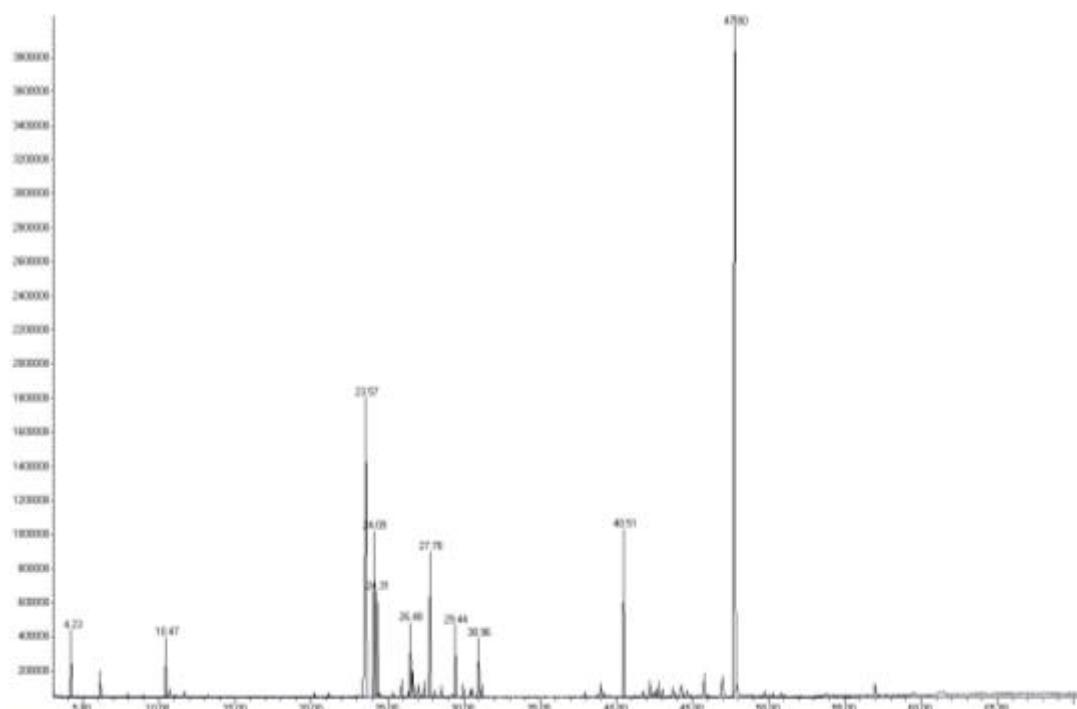


Figura 5. Perfil cromatográfico del aceite esencial de la columna HP-INNOWAX.

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

Cada uno de los picos que aparecen en los cromatogramas representan los compuestos que conforman el aceite esencial de *Bixa orellana*, el eje horizontal es el tiempo de retención, mientras que el eje vertical representa la cantidad del compuesto en el aceite, por lo tanto los picos más altos corresponden a los compuestos mayoritarios que conforman el aceite esencial.

En la tabla 12 se describen los resultados obtenidos tanto en la columna DB5-MS, como en la HP-INNOWAX; se detalla la composición química del aceite, el porcentaje correspondiente a cada uno de los compuestos, la media y la desviación estándar. Los compuestos mayoritarios se encuentran resaltados.

Tabla 12. Composición química del aceite esencial de *Bixa Orellana*.

N	Compuesto	DB5-MS							HP-INNOWAX						
		IR CAL	IR REF	% de cantidad relativa ⁺					IR CAL	IR REF	% de cantidad relativa ⁺				
				BO1	BO2	BO3	$\bar{X}$	σ			BO1	BO2	BO3	$\bar{X}$	σ
1	α -Pinene	922	932 ^a	1,42	0,67	2,09	1,40	0,71	1029	1027 ^c	1,28	0,42	0,84	0,85	0,43
2	β -Pinene	963	974 ^a	0,70	0,24	1,25	0,73	0,51	1105	1111 ^c	0,65	0,29	0,5	0,48	0,18
3	Ocimene <(Z)- β >	1027	1032 ^a	1,30	0,35	0,61	0,76	0,49	1237	1238 ^d	1,68	0,48	2,07	1,41	0,83
4	γ -Terpinene	1046	1054 ^a	0,34	0,30	0,17	0,27	0,09	1250	1253 ^c	0,29	0,32	0,28	0,30	0,02
5	α -Copaene	1351	1357 ^a	0,26	0,33	0,29	0,29	0,03	1270	1260 ^c	0,2	0,15	0,13	0,16	0,04
6	α -Bergamotene <cis>	1356	1364 ^a	3,34	3,05	3,03	3,14	0,17	1569	1566 ^c	3,02	3,15	3,87	3,35	0,46
7	β -Caryophyllene	1397	1389 ^a	4,34	4,80	4,2	4,45	0,31	1570	1572 ^e	3,87	4,13	4,02	4,01	0,13
8	α -Santalene	1400	1410 ^a	13,05	12,04	10,33	11,81	1,37	1582	1590 ^e	16,08	17,55	16,66	16,76	0,74
9	γ -Elemene	1405	1411 ^a	0,19	0,14	0,12	0,15	0,04	-	-	-	-	-	-	-
10	α -Bergamotene <trans>	1415	1417 ^a	6,10	5,65	4,73	5,49	0,70	1585	1582 ^f	5,97	6,55	6,31	6,28	0,29
11	Thujopsene	1423	1416 ^a	0,91	0,89	0,72	0,84	0,11	1588	1583 ^g	0,71	0,67	0,69	0,69	0,02
12	α -Humulene	1425	1434 ^a	0,29	0,34	0,32	0,32	0,02	-	-	-	-	-	-	-
13	β -Santalene	1427	1432 ^a	4,47	3,97	4,4	4,28	0,27	1641	1648 ^c	3,59	2,85	2,76	3,07	0,46
14	α -Amorphene	1432	1418 ^a	0,07	-	0,12	0,10	0,04	-	-	-	-	-	-	-
15	Germacrene D	1450	1445 ^a	0,49	-	0,9	0,70	0,29	1687	1694 ^h	0,46	0,6	0,58	0,55	0,08
16	γ -Curcumene	1458	1452 ^a	0,39	-	0,23	0,31	0,11	-	-	-	-	-	-	-
17	β -Farnesene	1461	1454 ^a	5,41	4,99	4,25	4,88	0,59	1669	16704 ⁱ	6,04	5,49	7,88	6,47	1,25
18	Bicyclogermacrene	1465	1457 ^a	1,75	2,12	1,9	1,92	0,19	1652	1648 ^j	1,22	2,04	1,89	1,72	0,44
19	α -Zingiberene	1473	1480 ^a	0,11	0,18	0,18	0,16	0,04	-	-	-	-	-	-	-
20	β -Bisabolene	1479	1484 ^a	2,06	1,44	0,2	1,23	0,95	1699	1704 ^k	2,73	1,48	2,35	2,19	0,64
21	δ -Cadinene	1490	1481 ^a	0,26	0,28	1,74	0,76	0,85	1738	1750 ^k	0,33	0,36	0,33	0,34	0,02
22	β -Sesquiphellandrene	1497	1505 ^a	2,12	2,16	1,01	1,76	0,65	1754	1767 ^k	2,15	2,46	2,41	2,34	0,17
23	(Z)- α -Bisabolene	1505	1500 ^a	0,57	0,35	1,57	0,83	0,65	1761	1758 ^l	0,32	0,46	0,42	0,40	0,07
24	Sesquisabinene <cis->	1508	1493 ^a	0,33	0,29	0,41	0,34	0,06	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 12. Continuación.

Tabla 12: Continuación.

25	Nerolidol	1519	1505 ^a	5,25	5,84	6,54	5,88	0,65	2002	2012 ^m	5,89	4,95	5,35	5,40	0,47
26	Spathulenol	1524	1522 ^a	0,54	0,64	1,09	0,76	0,29	2115	2121 ⁿ	0,62	0,9	0,85	0,79	0,15
27	Sesquisabinene<trans->	1547	1549 ^a	0,34	0,36	0,75	0,48	0,23	-	-	-	-	-	-	-
28	Guaiol	1556	1560 ^a	0,16	0,21	0,36	0,24	0,10	-	-	-	-	-	-	-
29	Acorenol	1626	1619 ^b	0,17	0,21	0,26	0,21	0,05	-	-	-	-	-	-	-
30	epi- α -Bisabolol	1655	1663 ^a	39,93	38,41	39,69	39,34	0,82	2182	2202 ^o	38,29	37,2	38,26	37,92	0,62
31	levomenol	1669	1659 ^a	1,12	1,63	1,44	1,40	0,26	2044	2050 ^k	1,4	1,74	1,36	1,50	0,21
*TOTAL IDENTIFICADO							95,22	-	*TOTAL IDENTIFICADO					96,95	-

+ = % promedio calculados en base al % de área de los picos reportados en la columna DB5-MS y HP-INNOWAX respectivamente.
* = Sumatoria del porcentaje relativo de los compuestos identificados en ambas columnas
BO1= Aceites de la primera recolección; BO2= Aceites de la segunda recolección; BO3= Aceites de la tercera recolección
 $\bar{X}$ = Promedio
 σ = Desviación estándar
Ikcal = Índice de Kóvats calculado
Ikref = Índice de retención de Kovats reportado en la literatura: aref.1; bref. 2; cref.3; dref. 4; eref. 5; fref. 6; gref. 7; href. 8; jref. 9; kref.10; lref. 11; mref. 12; nref. 13; oref. 14; pref. 15; gref. 16; rref 17; sref 18; tref 19. Ver anexo(VI)

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

En la figura 6 se muestran los compuestos mayoritarios que conforman el aceite esencial y su porcentaje según los resultados de la columna DB5-MS. Los compuestos mayoritarios corresponden el 76,13% de la composición total del aceite. El compuesto que predomina es el epi- α -Bisabolol con casi un 40%.

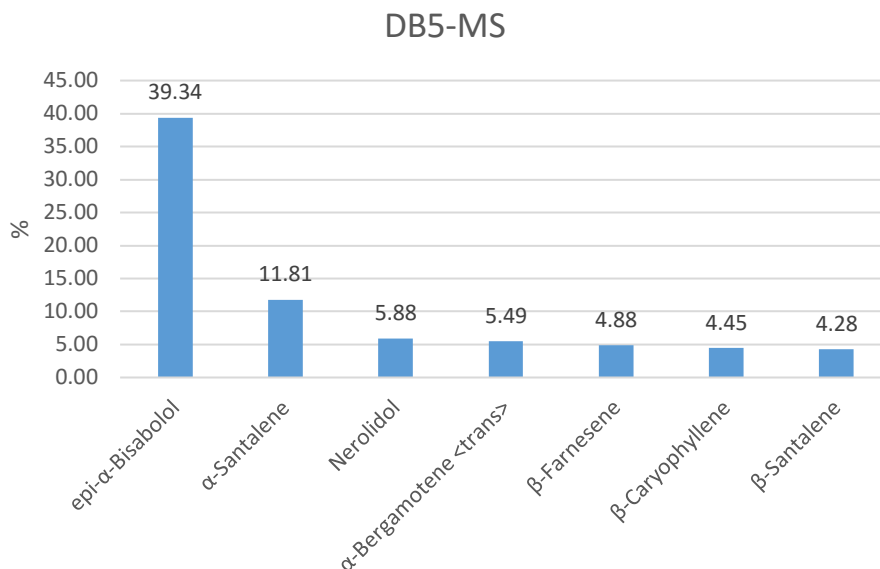


Figura 6. Compuestos mayoritarios del aceite esencial según DB5-MS.

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

En la figura 7 se muestran los compuestos mayoritarios que conforman el aceite esencial según los resultados de la columna HP-INNOWAX. En este caso los compuestos mayoritarios corresponden el 79,91% de la composición total del aceite. En ambas columnas se identificaron los mismos compuestos mayoritarios con una ligera variación en el porcentaje de cada uno de ellos.⁵

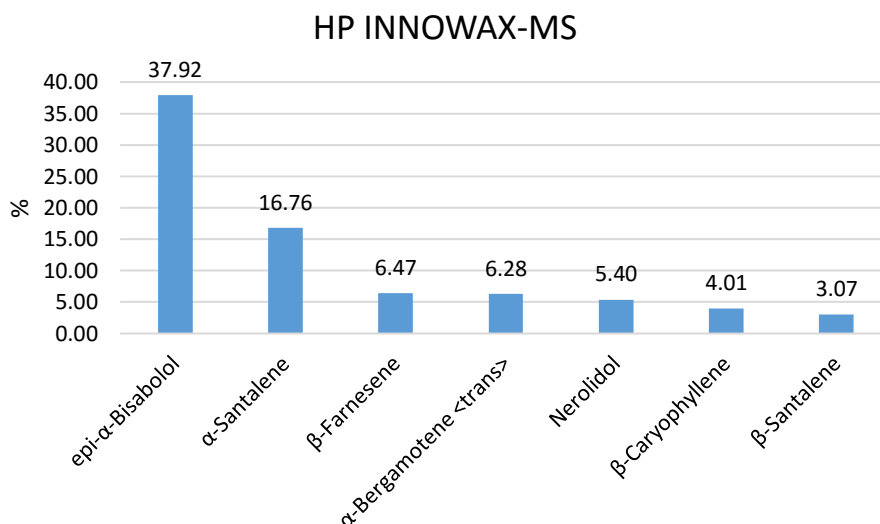


Figura 7. Compuestos mayoritarios del aceite esencial según HP-INNOWAX.

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

En la tabla 13 se muestran los resultados obtenidos de las corridas cromatográficas con el detector de ionización de llama FID, comparados con los porcentajes obtenidos de masas, con los cuales se puede realizar el análisis cuantitativo de los compuestos que conforman el aceite esencial. También se expresa la media y la desviación estándar de cada uno de los valores.

Tabla 13. Porcentajes relativos de cada uno de los compuestos de CG-MS y CG-FID.

N	Compuesto	DB5-MS										HP-INNOWAX											
		% de cantidad relativa ⁺						$\bar{X}$		σ		% de cantidad relativa ⁺						$\bar{X}$		σ			
		BO1		BO2		BO3						BO1		BO2		BO3							
		MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID		
1	α -Pinene	1,42	1,04	0,67	0,54	2,09	1,67	1,40	1,08	0,71	0,57	1,28	1,21	0,42	0,62	0,84	0,65	0,85	0,83	0,43	0,33		
2	β -Pinene	0,70	0,57	0,24	0,23	1,25	1,12	0,73	0,64	0,51	0,45	0,65	0,69	0,29	0,29	0,5	0,48	0,48	0,49	0,18	0,20		
3	Ocimene <(Z)- β >	1,30	1,81	0,35	0,39	0,61	0,82	0,76	1,01	0,49	0,73	1,68	1,6	0,48	0,49	2,07	2,17	1,41	1,42	0,83	0,85		
4	γ -Terpinene	0,34	0,35	0,30	0,29	0,17	0,17	0,27	0,27	0,09	0,09	0,29	0,4	0,32	0,26	0,28	0,25	0,30	0,30	0,02	0,08		
5	α -Copaene	0,26	0,12	0,33	0,3	0,29	0,26	0,29	0,23	0,03	0,09	0,2	0,15	0,15	0,17	0,13	0,1	0,16	0,14	0,04	0,04		
6	α -Bergamotene <cis>	3,34	3,16	3,05	3,15	3,03	3,3	3,14	3,20	0,17	0,08	3,02	3,07	3,15	2,98	3,87	3,69	3,35	3,25	0,46	0,39		
7	β -Caryophyllene	4,34	4,31	4,80	4,9	4,2	4,42	4,45	4,54	0,31	0,31	3,87	3,99	4,13	4,25	4,02	4,16	4,01	4,13	0,13	0,13		
8	α -Santalene	13,05	16,72	12,04	13,04	10,33	10,54	11,81	13,43	1,37	3,11	16,08	16,13	17,55	17,45	16,66	16,42	16,76	16,67	0,74	0,69		
9	γ -Elemene	0,19	0,22	0,14	0,17	0,12	0,2	0,15	0,20	0,04	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
10	α -Bergamotene <trans>	6,10	5,86	5,65	6,04	4,73	4,54	5,49	5,48	0,70	0,82	5,97	5,89	6,55	6,14	6,31	6,43	6,28	6,15	0,29	0,27		
11	Thujopsene	0,91	0,17	0,89	0,89	0,72	0,7	0,84	0,59	0,11	0,37	0,71	0,9	0,67	0,74	0,69	0,56	0,69	0,73	0,02	0,17		
12	α -Humulene	0,29	0,18	0,34	0,19	0,32	0,2	0,32	0,19	0,02	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
13	β -Santalene	4,47	3,88	3,97	3,89	4,4	4,47	4,28	4,08	0,27	0,34	3,59	3,45	2,85	2,79	2,76	2,65	3,07	2,96	0,46	0,43		
14	α -Amorphene	0,07	0,03	-	-	0,12	0,3	0,10	0,17	0,04	0,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
15	Germacrene D	0,49	0,5	-	-	0,9	0,82	0,70	0,66	0,29	0,23	0,46	0,56	0,6	0,66	0,58	0,6	0,55	0,61	0,08	0,05		
16	γ -Curcumene	0,39	0,45	-	-	0,23	0,22	0,31	0,34	0,11	0,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
17	β -Farnesene	5,41	6,17	4,99	4,2	4,25	3,91	4,88	4,76	0,59	1,23	6,04	5,98	5,49	5,55	7,88	6,58	6,47	6,04	1,25	0,52		

Tabla 13. Continuación.

18	Bicyclogermacrene	1,75	1,82	2,12	2,04	1,9	1,87	1,92	1,91	0,19	0,12	1,22	1,15	2,04	1,94	1,89	1,73	1,72	1,61	0,44	0,41
19	α -Zingiberene	0,11	0,14	0,18	0,12	0,18	0,16	0,16	0,14	0,04	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	β -Bisabolene	2,06	2,02	1,44	1,6	0,2	0,22	1,23	1,28	0,95	0,94	2,73	2,63	1,48	1,43	2,35	2,26	2,19	2,11	0,64	0,61
21	δ -Cadinene	0,26	0,19	0,28	0,31	1,74	1,58	0,76	0,69	0,85	0,77	0,33	0,37	0,36	0,39	0,33	0,39	0,34	0,38	0,02	0,01
22	β - Sesquiphellandrene	2,12	2,53	2,16	2,23	1,01	1,47	1,76	2,08	0,65	0,55	2,15	2,33	2,46	2,54	2,41	2,56	2,34	2,48	0,17	0,13
23	(Z)- α -Bisabolene	0,57	0,45	0,35	0,4	1,57	1,68	0,83	0,84	0,65	0,73	0,32	2,33	0,46	0,44	0,42	0,48	0,40	1,08	0,07	1,08
24	Sesquisabinene <cis->	0,33	0,3	0,29	0,27	0,41	0,5	0,34	0,36	0,06	0,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	Nerolidol	5,25	5,97	5,84	6,73	6,54	6,25	5,88	6,32	0,65	0,38	5,89	5,69	4,95	5,06	5,35	5,23	5,40	5,33	0,47	0,33
26	Spathulenol	0,54	0,61	0,64	0,44	1,09	1,13	0,76	0,73	0,29	0,36	0,62	0,7	0,9	0,98	0,85	0,81	0,79	0,83	0,15	0,14
27	Sesquisabinene <trans->	0,34	0,37	0,36	0,35	0,75	0,8	0,48	0,51	0,23	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	Guaiol	0,16	0,18	0,21	0,25	0,36	0,35	0,24	0,26	0,10	0,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	Acorenol	0,17	0,27	0,21	0,26	0,26	0,28	0,21	0,27	0,05	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	epi- α -Bisabolol	39,93	39,88	38,41	36,84	39,69	40,11	39,34	38,94	0,82	1,83	38,29	37,29	37,2	36,98	38,26	37,89	37,92	37,39	0,62	0,46
31	levomenol	1,12	1,10	1,63	1,55	1,44	1,4	1,40	1,35	0,26	0,23	1,4	1,23	1,74	1,54	1,36	1,22	1,50	1,33	0,21	0,18
*TOTAL IDENTIFICADO								95,22	96,53			*TOTAL IDENTIFICADO						96,95	96,25		
+ = % promedio calculados en base al % de área de los picos reportados en la columna DB5-MS y HP-INNOWAX respectivamente. * = Sumatoria del porcentaje relativo de los compuestos identificados en ambas columnas BO1= Aceites de la primera recolección; BO2= Aceites de la segunda recolección; BO3= Aceites de la tercera recolección $\bar{X}$ = Promedio σ = Desviación estándar																					

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

Se identificaron 31 compuestos mediante la columna no polar DB5-MS, lo cual corresponde al 95,22%; mientras que mediante la columna polar HP-INNOWAX se identificaron 22 compuestos, lo cual corresponde a un porcentaje de 96,95%.

Existen escasos estudios sobre la composición química del aceite esencial de la hoja *Bixa orellana*. Rojas (2016) reporta como compuestos mayoritarios el epi- α -bisabolol (28,41%); β -selineno (9,34%); β -bisaboleno (8,59%); trans-cariofileno (7,63%) y α -selineno (7,24%). Giwa-Ajeniya et al. (2016) reporta los siguientes compuestos mayoritarios: α -guaiene (49.3%), guaiol (8.1%), valencene (7.7%) y β -elemene (5.9%).

En los diversos estudios sobre la composición química del aceite que se han realizado, existe gran variabilidad en su composición, esta gran diversidad química en los aceites esenciales suele deberse a la capacidad de la planta de adaptarse y responder a las diferentes condiciones en las que se desarrolla, como el clima, el suelo, exposición solar y la geografía (Ciccio & Ocampo, 2006).

3.5. Actividad biológica

3.5.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana

En la tabla 14 se reportan los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana evaluada en las diferentes cepas bacterianas mencionadas en la metodología.

Tabla 14. CMI antibacteriana del aceite esencial de *Bixa orellana*.

		CMI ($\mu\text{g/ml}$)				
		Microorganismos				
		<i>Candida albicans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
Aceite esencial	BO1	3693	1846	1846	-	115
	BO2	3693	1846	1846	-	115
	BO3	3693	1846	1846	-	115
Control positivo	Gentamicina	-	<0,195	-	<0,195	<0,195
	Tetraciclina	-	-	<0,78	-	-
	Itraconazol	25	-	-	-	-

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

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

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

El aceite presentó una actividad moderada frente a *Micrococcus luteus*, mientras que frente a *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* fue inactivo, y de igual manera frente a la bacteria gram negativa *Escherichia coli* no hubo actividad alguna. Hasta el momento no se ha reportado información sobre la actividad antimicrobiana del aceite esencial de la hoja de *Bixa Orellana*.

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales no se atribuye a un solo compuesto, ya que existe gran variedad de compuestos presentes en los mismos, por lo tanto no se da un mecanismo específico para detener el crecimiento microbiano. Sin embargo los mecanismos que pueden darse son los siguientes; daño a la membrana citoplasmática o a las proteínas, degradación de la pared celular, filtración del contenido celular, coagulación del citoplasma o disminución de la fuerza motriz. (Friedman, Henika, & Mandrell, 2002)

3.6. Actividad antioxidante

3.6.1 Método ABTS⁺.

En la tabla 15 se observan los resultados obtenidos de la actividad antioxidante del aceite esencial según el método ABTS⁺.

Tabla 15. Actividad antioxidante según el método ABTS⁺.

Dosis (µg/ml)	% secuestro	µM ET/g aceite	$\bar{X}$	σ	µM ET/g hoja fresca	$\bar{X}$	σ
576,12	78,42	69,5223	70,2927	0,8835	0,1112	0,1126	0,0014
576,12	80,08	70,3671			0,1126		
576,12	81,89	71,2888			0,1141		

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

3.6.2. Método DPPH.

En la tabla 16 se observan los resultados obtenidos de la actividad antioxidante del aceite esencial según el método DPPH.

Tabla 16. Actividad antioxidante según el método DPPH.

Dosis ($\mu g/ml$)	% secuestro	μM ET/g aceite	$\bar{X}$	σ	μM ET/g hoja fresca	$\bar{X}$	σ
4608,95	5,08	4,3435	4,3298	0,0624	0,0069	0,0069	0,0001
4608,95	6,55	4,3843			0,0070		
4608,95	5,31	4,2617			0,0068		

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

El aceite esencial de *Bixa orellana* presentó actividad antioxidante, los valores fueron superiores en el método ABTS⁺, esto puede deberse a que el método ABTS⁺ es más afín a moléculas polares, como los alcoholes de los aceites esenciales, mientras que el DPPH es más afín a moléculas no polares (Huang et al., 2005).

se debe a que este es un método lipofílico, es decir, que tiene afinidad con lípidos, al estar constituido el aceite esencial por lípidos es comprensible que presentara una mayor actividad en este método. Mientras que en el método DPPH es hidrofílico, es decir, que tiene afinidad por el agua, por lo tanto la actividad mediante este método es más baja, de 4,3435 μM ET/g aceite.

El radical libre DPPH es considerado como un modelo de radical lipofílico

Hasta la actualidad no hay reportes de la actividad antioxidante del aceite esencial de la hoja de *Bixa orellana*. Sin embargo, Shilpi et al. (2006) reporta que el extracto metanólico de hojas de *Bixa orellana* evaluado por el método DPPH, posee una propiedad antioxidante considerable, con un CI_{50} de 22,36 $\mu g/ml$.

Por lo tanto, en comparación con el extracto metanólico de la hoja de *Bixa orellana*, el aceite esencial de la misma especie presenta una actividad antioxidante muy baja, ya que se necesita una dosis de 576,12 $\mu g/ml$ para alcanzar un % de secuestro del 70,29%; mientras que el extracto con una dosis de 22,36 $\mu g/ml$ consigue secuestrar el 50% de los radicales libres.

La actividad antioxidante de un extracto se atribuye generalmente a la presencia de compuestos fenólicos, por lo tanto, la baja actividad de secuestro de radicales presentada

por el aceite esencial se debe a que este no contiene compuestos de este tipo (Ciappini, Stoppani, Martinet, & Álvarez, 2013).

CONCLUSIONES

- El aceite esencial de la hoja de *Bixa orellana* obtenido presentó un rendimiento bajo ya que se encuentra por debajo del 1%, es menos denso que el agua; presenta un índice de refracción dentro del rango establecido para aceites esenciales; y es ópticamente activo ya que es una mezcla que contiene mayormente compuestos dextrorrotatorios.
- El aceite esencial está compuesto principalmente por epi- α -Bisabolol, α -Santalene; nerolidol, α -Bergamotene, β -Farnesene, β -Caryophyllene y β -Santalene.
- El aceite esencial presentó actividad antimicrobiana moderada frente a *Micrococcus luteus*, y no fue activo frente a *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*.
- El aceite esencial presentó actividad antioxidante muy baja, ya que se requiere de dosis muy altas para secuestrar el 50% de los radicales libres.

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de la actividad inhibitoria del aceite esencial de *Bixa Orellana* en otras cepas bacterianas y de hongos, ya que diversos estudios mencionan que extractos obtenidos de la hoja de esta especie presentan resultados positivos frente a gran variedad de bacterias y hongos.
- Evaluar el aceite esencial de *Bixa orellana* procedente del fruto y el de la semilla.

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, D. (2013). Composición Química del Aceite Esencial de Hojas de Orégano (*Origanum vulgare*). *Química y Aplicaciones*, 24(4), 43-48.
- Acosta, M. (1992). *Vademécum de plantas medicinales del Ecuador*. Quito, Ecuador: Ediciones Abya-Yala. 243.
- Adelantado, C., Arosemena, L., Calvo, M., Manteca, L., Martín, M., Ordóñez, G., Zekaria, D. (2004). *La Salmonella, de actualidad desde siempre*. Real Escuela de Avicultura. 16.
- Atkins, W., & Jones, L. (2006). *Principios de química: los caminos del descubrimiento* (3ª edición ed.). Editorial Médica Panamericana. 134.
- Balslev, H., Navarrete, H., de la Torre, L., & Macía, M. (2008). Enciclopedia de las plantas útiles de Ecuador. *Herbario QCA & Herbario AAU*, 1-3.
- Bandoni, A. (2000). *Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores*. Argentina: Red de Editoriales Universitarias. 58.
- Barreto, J. (1997). *Efectos Antimicrobianos del diente de león (Taxaxacum officinale) y el gualanday (Jacaranda obtusifolia) sobre Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa causantes de enfermedades de la piel*. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad Ciencias Básicas, Bogotá. 63.
- Berg, H. (2004). *E. coli in Motion*. Cambridge, USA: Springer Science & Business Media. 75.
- Boa, E. (2005). Los hongos silvestres comestibles: perspectiva global de su uso e importancia para la población. Roma: FAO. 13(1), 25.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
- Cárdenas, D., Arias, J., & López, R. (2004). *Árboles y arbustos de la ciudad de Leticia*. Colombia: Equilátero.
- Cerón, C., & Reina, M. (1996). Plantas medicinales de los mercados de Ibarra, Imbabura- Ecuador. *Universidad Central del Ecuador*.
- Cicció, J., & Ocampo, R. A. (2006). Variación anual de la composición química del aceite esencial de Lippia Alba (Verbenaceae) cultivada en Costa Rica. *LANKESTERIANA*, 6(3), 152.
- Ciappini, M., Stoppani, F., Martinet, R., & Álvarez, M. (2013). Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en mieles de tréboles, eucalipto y alfalfa. *Revista de Ciencia y Tecnología*(19), 45-51.
- Costa-Batlloorí, P. (2003). Antioxidantes naturales en alimentación animal. conferencia inaugural del curso académico 2003-2004. *Real Academia de Ciencias Veterinarias*. 68-70.

- Cuenca, J. (2 de Febrero de 2013). *Plantas Medicinales Del Ecuador*. Obtenido de Plantas Medicinales y su poder curativo: <http://plantasmedicinalesecuador.blogspot.com/2013/02/plantas-medicinales-y-su-poder-curativo.html>
- Estrella, J. (2005). *Biodiversidad y recursos genéticos*. Quito: Abya Yala. 59-60.
- Ezer, N., & Abbasoglu, U. (1996). Antimicrobial activity of essential oils of some sideritis species growing in turkey. *Fitoterapia*, 67(5), 474-475.
- Fonnegra, R., & Jiménez, S. (1999). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia. 543-545.
- Fonnegra, R., & Jiménez, S. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia* (2ª edición ed.). Medellín, Colombia: Editorial Universidad de Antioquia. 287.
- Forbes, B. (2009). *Diagnostico Microbiologico* (12ª edición ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana. 97-99.
- Friedman, M., Henika, P. R., & Mandrell, R. E. (Octubre de 2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 65(10), 1545-1560.
- García, V. (2004). *Introducción a la microbiología* (2ª edición ed.). Costa Rica: EUNED. 82.
- Gennaro, A. (2003). *Remington: Farmacia* (20ª edición ed., Vol. 1). Editorial Médica Panamericana. 374.
- Giwa-Ajeniya, A., Ademefun, A., Lawal, O. A., & Ogunwande, I. A. (21 de Diciembre de 2016). Chemical Composition of Essential Oils from the Leaves, Seeds, Seed-pods and Stems of *Bixa orellana* L. (Bixaceae). *ACRI*, 6(3), 3-4.
- Gutiérrez, M. (2003). *Nuevas perspectivas en resistencia a quinolonas fluoradas en Staphylococcus Aureus. Mecanismos de flujo activo y otros mecanismos de resistencia a quinolonas de tercera generación*. Salamanca, España: Ediciones Universidad de Salamanca. 427-430.
- Hirasa, K., & Takemasa, M. (2002). *Tecnología de las Especies*. Zaragoza, España: Editorial Acribia. 189.
- Huang, D., Ou, B., and Prior, R.L. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* 53:1841-1856.
- INSHT, (2012). *Candida albicans*. Fichas de agentes biológicos, Instituto nacional de seguridad higiene en el trabajo (INSHT). 9-10.
- León, J. (2000). *Botánica de los cultivos tropicales* (3ª edición ed.). San José, Costa Rica: Agroamérica. 37.
- Luna, H. (2007). *OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DE LA DESTERPENACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE NARANJA (Citrus sinensis)*. UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER, ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA, Bucaramanga. 80.

- Macarulla, J., & Goñi, F. (1994). *Bioquímica humana*. Barcelona, España: Reverté S.A. 504.
- Maguna, F., Romero, A., Garro, O., & Okulik, N. (2006). Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, 57.
- Manrique, E., & Mosquera, O. (1997). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones obtenidas a partir de Espeletia murilloi cuatr. Y Espeletopsis guacharaca*. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de ciencias básicas, Bogotá. 5-7.
- Marcanno, D., & Masahisa, H. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela. 152.
- Marcia, A. (Agosto de 2011). SECTOR DE HIERBAS AROMÁTICAS Y CERTIFICACIÓN DEL SISTEMA DE GESTIÓN DE INOCUIDAD ALIMENTARIA ISO 22000. *EIDOS*(4). 12.
- Martínez, A. (2003). *Aceites Esenciales*. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia Facultad Química Farmacéutica. 267-272.
- Monodane, T., Kawabata, Y., Yang, S., Hase, S., & Takada, H. (2001). Induction of necrosis factor- α and interleukin-6 in mice in vivo and in murine peritoneal macrophages and human whole blood cells in vitro by *Micrococcus luteus* teichuronic acids. *J. Med. Microbiol.*, 50(4), 12.
- Muñoz, F. (2002). *Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado*. Madrid, España: Mundi-Prensa. 172.
- Murillo, E., Fernández, K., Sierra, D. M., & Viña, A. (2004). Caracterización físico-química del aceite esencial de albahaca. II. *Revista Colombiana de Química*, 33(2), 141-142.
- Negroni, M. (2009). *Microbiología Estomatológica* (2ª edición ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana. 480-482.
- Ordoñez, E. (2016). *Indumentaria y adaptabilidad: el clima como factor influyente en el diseño y la tecnología. Casos: zonas subtropicales*. Universidad del Azuay, Facultad de diseño , Cuenca. 15.
- Ortuño, M. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. Madrid, España: AIYANA Ediciones. 144.
- Prats, G. (2005). *Microbiología Clínica*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana. 566-570.
- Peredo, H., Palou, G., & López, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 24-32.
- Pickering, W. (1980). *Química analítica moderna*. España: Editorial Reverté S.A. 367-370.
- Pierce, B. (2010). *Genética: Un enfoque conceptual* (3ª edición ed.). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana. 211.
- Rivera, D. (2008). *CARACTERIZACIÓN DE ACEITES ESENCIALES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES DE TRES ESPECIES DEL GÉNERO PIPER Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. 6-9.

- Rojas, K. (2016). *Caracterización física y química de aceites esenciales de especies aromáticas de la Región Sur del Ecuador*. Universidad Técnica Particular De Loja, Loja. 56-58.
- Romero, M. (2004). *Plantas Aromáticas*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Kier. 189.
- Romero, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana* (3ª edición ed.). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana. 428.
- Sanz, E. (2015). *Aromaterapia. El poder sanador de los aromas naturales*. Barcelona, España: Hispano Europea. 90-92.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Bogotá, Colombia: Convenio Andres Bello. 117-118.
- Shilpi, J. A., Taufiq-Ur-Rahman, M., Uddin, S. J., Alam, M. S., Sadhu, S. K., & Seidel, V. (2006). Preliminary pharmacological screening of *Bixa orellana* L. leaves . *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 264-271.
- Stashenko, E. (2009). *Aceites Esenciales*. Bucaramanga, Colombia: CENIVAM. 276.
- Toledo, B. (2009). *Pseudomona: Germisol... un mensaje de esperanza a la salud y la vida*. México D.F., México: Innovación Editorial Lagares de México. 28.
- Valcárcel, M., & Gómez, A. (1988). *Técnicas Analíticas de separación*. Barcelona, España: Editorial Reverté, S. A. 88-90.
- Vargas, W. (2002). *Guía ilustrada de las plantas de las montañas del Quindío y los Andes Centrales*. Caldas, Colombia: Universidad de Caldas. 45-47.
- Vilaplana, M. (Noviembre de 2007). Antioxidantes presentes en los alimentos. *OFFARM*, 26(10), 79.
- Wankat, P. (1988). *Equilibrium Staged Separations* . Amsterdam: Prentice Hall. 211-215.

ANEXOS

ANEXO I

DETERMINACIÓN DE HUMEDAD RELATIVA

PRINCIPIO:

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

MATERIAL:

- Lámpara
- Pinza
- Balanza
- Crisol
- Desecador

PROCEDIMIENTO:

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

CÁLCULO:

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

Dónde:

Hm: %de humedad

m: peso de la cápsula vacía (gr)

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

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

ANEXO II

DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO

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

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

Dónde:

R: % de Rendimiento.

V: Volumen del aceite esencial extraído en mL.

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

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

Según la AFNOR NF T 75-111 JUNIO 1982

PROPUESTA:

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

OBJETIVO DE APLICACIÓN:

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

REFERENCIAS:

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

PRINCIPIO:

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

NOTA:

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

APARATOS:

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

PROCEDIMIENTO:

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

EXPRESIÓN DE RESULTADOS:

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

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

Dónde:

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

m_0 : masa en gramos del picnómetro vacío.

m_1 : masa en gramos del picnómetro con agua.

m_2 : masa en gramos del picnómetro con aceite esencial.

Se expresarán los resultados con tres decimales.

ANEXO IV
DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN
(Método de Referencia)

Según la AFNOR NF T 75-112 /1988

PRINCIPIO:

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

DEFINICIÓN:

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

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

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

APARATOS:

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

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

1.3330 para agua destilada.

1.4906 para el p-cimeno.

1.5685 para el benzoato de bencilo.

1.6585 para el 1-bromo naftaleno.

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

MODO DE OPERACIÓN:

Determinación

Pasar una corriente de agua en el refractómetro, a fin de mantener el aparato a la temperatura de referencia de 20°C salvo para los aceites esenciales que no son líquidos a esa temperatura. En este caso deben adoptarse las temperaturas de 20°C y 30°C, según el

punto de fusión del aceite esencial considerado. Esta temperatura no debe diferir de la temperatura de referencia más de $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ y debe mantenerse a $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$.

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

Resultados:

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

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

Dónde:

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

F = factor de corrección (0.0004)

t' = temperatura a la que se efectuó la lectura

t = temperatura a 20°C

Nota:

Expresar los resultados con cuatro cifras decimales.

La precisión de la determinación es de ± 0.0002 .

ANEXO V

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ÓPTICA

PRINCIPIO:

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

DEFINICIONES:

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

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

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

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

REACTIVOS:

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

SOLVENTE:

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

APARATOS:

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

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

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

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

determinación de la temperatura ambiente ver el tipo de tubo de ensayo que se debe utilizar, si bien es aconsejable utilizar los descritos en la parte anterior.

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

PROCEDIMIENTO:

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

RESULTADOS:

Cálculos y fórmulas

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

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

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

I = es la longitud del tubo usado en mm.

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

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

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

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

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

Dónde:

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

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

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

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

Dónde:

α = Actividad óptica calculada

αl = Actividad óptica leída

l = Dimensión del tubo (dm)=1

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

c = Concentración muestra (gr/ml)

ANEXO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS INDICE DE KOVATS

^aref. 1; ^bref. 2; ^cref. 3; ^dref. 4; ^eref. 5; ^fref. 6; ^gref. 7; ^href. 8; ⁱref. 9; ^jref.10; ^kref. 11; ^lref. 12; ^mref. 13; ⁿref. 14; ^oref. 15; ^pref. 16; ^qref. 17; ^rref. 18; ^sref. 19; ^tref. 20.

1. Adams, R. P., Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation: 2007.
2. Özel, M.Z.; Gögüs, F.; Lewis, A.C., Determination of *Teucrium chamaedrys* volatiles by using direct thermal desorption-comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 2006, 1114, 1, 164-169.
3. Frizzo, C.D.; Serafini, L.A.; Dellacassa, E.; Lorenzo, D.; Moyna, P., Essential oil of *Baccharis uncinella* DC. from Southern Brazil, *Flavour Fragr. J.*, 2001, 16, 4, 286-288.
4. Stashenko, E.E.; Cervantes, M.; Combariza, Y.; Martínez, J.R., HRGC-FID-MSD Analysis of the Secondary Metabolites Obtained by Different Extraction Methods from *Lepechinia schiedeana*, and Evaluation of its Antioxidant Activity in vitro in 20th International Symposium on Capillary Chromatography, 1998, 1-11.
5. Choi, H.-S., Aroma evaluation of an aquatic herb, changpo (*Acorus calamus* Var. *angustatus* Bess), by AEDA and SPME, *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 26, 8099-8104.
6. Christensen, L.P.; Jakobsen, H.B.; Paulsen, E.; Hodal, L.; Andersen, K.E., Airborne *compositae* dermatitis: monoterpenes and not parthenolide are released from flowering *Tanacetum parthenium* (feverfew) plants, *Arch. Dermatol. Res.*, 1999, 291, 7-8, 425-431.
7. Baser, K.H.C.; Demirci, B.; Dekebo, A.; Dagne, E., Essential oils of some *Boswellia* spp., myrrh and opopanax, *Flavour Fragr. J.*, 2003, 18, 2, 153-156.
8. J. Kim, et al., Fumigant and contact toxicity of 22 wooden essential oils and their major components against *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae), *Pesticide Biochemistry and Physiology* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.03.007>
9. Bertes, C.M.; Freije, J.R.; van der Woude, H.; Verstappen, F.W.A.; Perk, L.; Marquez, V.; De Kraker, J.-W.; Posthumus, M.A.; Jansen, B.J.M.; de Groot, Ae.; Franssen, M.C.R.; Bouwmeester, H.J., Identification of intermediates and enzymes involved in the early steps of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*, *Planta Med.*, 2005, 71, 1, 40-47.
10. Flamini, G.; Tebano, M.; Cioni, P.L.; Bagci, Y.; Dural, H.; Ertugrul, K.; Uysal, T.; Savran, A., A multivariate statistical approach to *Centaurea* classification using essential oil composition data of some species from Turkey, *Pl. Syst. Evol.*, 2006, 261, 1-4, 217-228.
11. Bisio, A.; Ciarallo, G.; Romussi, G.; Fontana, N.; Mascolo, N.; Capasso, R.; Biscardi, D., Chemical Composition of Essential Oils from some *Salvia* species, *Phytother. Res.*, 1998, 12, S1, s117-s120.

12. Duman, H.; Kartal, M.; Altun, L.; Demirci, B.; Baser, K.H.C., The essential oil of *Stachys laetivirens* Kotschy Boiss. ex Rech. fil., endemic in Turkey, *Flavour Fragr. J.*, 2005, 20, 1, 48-50.
13. Kundakovic, T.; Fokialakis, N.; Kovacevic, N.; Chinou, I., Essential oil composition of *Achillea lingulata* and *A. umbellata*, *Flavour Fragr. J.*, 2007, 22, 3, 184-187.
14. Baser, K.H.C.; Demirci, B.; Kirimer, N.; Satil, F.; Tumen, G., The essential oils of *Thymus migricus* and *T. fedtschenkoi* var. *handelii* from Turkey, *Flavour Fragr. J.*, 2002, 17, 1, 41-45.
15. Saroglou, V.; Marin, P.D.; Rancic, A.; Veljic, M.; Skaltsa, H., Composition and antimicrobial activity of the essential oil of six *Hypericum* species from Serbia, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2007, 35, 3, 146-152.
16. Feng, T.; Cui, J.-J.; Xiao, Z.-B.; Tian, H.-X.; Yi, F.-P.; Ma, X., Chemical composition of essential oil from the peel of Chinese *Torreya grandis* Frt, *Org. Chem. International*, 2011, 2011, 1-5.
17. Demirci, B.; Demirci, F.; Baser, K.H.C., Headspace-SPME and hydrodistillation of two fragrant *Artemisia* sp., *Flavour Fragr. J.*, 2005, 20, 4, 395-398.
18. Piasenzotto, L.; Gracco, L.; Conte, L., Solid phase microextraction (SPME) applied to honey quality control, *J. Sci. Food Agric.*, 2003, 83, 10, 1037-1044.
19. Tabanca, N.; Demirci, B.; Ozek, T.; Kirimer, N.; Can Baser, K.H.; Bedir, E.; Khan, I.A.; Wedge, D.E., Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of essential oils from *Pimpinella* species gathered from Central and Northern Turkey, *J. Chromatogr. A*, 2006, 1117, 2, 194-205.
20. Stashenko, E.E.; Jaramillo, B.E.; Martínez, J.R., Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia verbenaceae, *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exactas Fis. Nat.*, 2003, 27, 105, 579-597.

ANEXO VII

INDICE DE KOVATS

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

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

Dónde:

IK: Índice de retención de Kovats

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

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

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

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

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