



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO

Extracción, caracterización física y química, y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de la especie conocida como chilchi *Tagetes terniflora* de la provincia de Loja.

TRABAJO DE TITULACION

AUTOR: González Dávila, Alex Israel

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

LOJA – ECUADOR

2018



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>

2018

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.d.

Benito Eduardo Valarezo Valdez

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: **“Extracción, caracterización física y química, y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de la especie conocida como chilchi (*Tagetes terniflora*) de la provincia de Loja.”** realizado por González Dávila Alex Israel, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo

Loja, marzo de 2018

f) _____

DECLARACION DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, González Dávila Alex Israel declaro ser autor del presente trabajo de titulación: **“Extracción, caracterización física y química, y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de la especie conocida como chilchi (*Tagetes terniflora*) de la provincia de Loja.”** de la titulación de Ingeniería Química, siendo Benito Eduardo Valarezo Valdez director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

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

f. _____

Autor: Alex Israel González Dávila

Cédula: 1103742050

DEDICATORIA

A mis padres.

Digna Victoria Dávila y Alcívar Antoliano González, pilares fundamentales para la realización del presente trabajo; que con su paciencia, tolerancia y motivación constante supieron mostrar el camino hasta ver culminada la presente obra. Pero sobre todo por su amor incondicional.

A mi esposa.

Maritza Elizabeth Meza, que día a día has sabido guiar mis pasos. Sin tú impulso este trabajo no se hubiera concluido; sin olvidar al amigo que esta entre nosotros y que a través de su mirada recuerda lo duro y arduo que ha sido lograr este fin.

A mi hermano y familiares.

Quienes con su voz de aliento participaron directa o indirectamente en la realización de la presente tesis. ¡Gracias a todos!

Alex I. González D.

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento sincero y fraterno a todas y cada una de las personas que con sus voces de aliento y motivación permitieron que este su servidor no desmaye en alcanzar el objetivo propuesto. A mis padres, a mi esposa, a mi hermano, a mis familiares, amigos y demás personas involucradas en la realización del presente proyecto de fin de titulación.

Agradezco a mis docentes que a través de sus conocimientos y experiencias supieron guiar y formar un profesional con valores éticos y morales.

Mi agradecimiento especial a mi director de tesis que con su manera de orientar y aportar con sus conocimientos en este trabajo se ha ganado mi admiración y respeto. Más allá de lo mencionado, su paciencia, motivación y amistad han llevado a cavar en mí de manera muy profunda cada una de sus enseñanzas. ¡Gracias amigo y colega Ing. Benito E. Valarezo!

Finalmente, mi agradecimiento a quien este leyendo este apartado y más de mi tesis, que los conocimientos de la presente investigación sean de utilidad y se guarden en el repertorio de su memoria.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARATULA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORÍA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO I.....	5
MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Aceites esenciales.....	6
1.1.1. Extracción.....	7
1.1.2. Clasificación.....	9
1.1.3. Caracterización.....	10
1.1.3.1. <i>Cromatografía de gases</i>	10
1.1.4. Propiedades.....	11
1.1.5. Usos y aplicaciones.	12
1.2. Actividad Biológica.....	13
1.2.1. Bacterias.....	14
1.2.1.1. <i>Bacterias gram-positivas</i>	15
1.2.1.2. <i>Bacterias gram-negativas</i>	16
1.2.2. Hongos.....	18
1.3. Plantas medicinales.....	19
1.4. Flora Ecuatoriana.....	21
1.4.1. Flora aromática del Ecuador.....	22
1.5. La Familia Asteraceae.....	23
1.5.1. El género <i>Tagetes</i>	24
1.5.1.1. <i>Tagetes terniflora</i>	25
CAPITULO II.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
2.1. Metodología.....	28

2.1.1. Recolección del material vegetal.....	29
2.1.2. Determinación de la humedad de la planta.....	29
2.1.3. Extracción del aceite esencial.....	30
2.1.3.1. <i>Determinación del rendimiento</i>	31
2.1.4. Determinación de las propiedades físicas.....	31
2.1.4.1. <i>Densidad relativa</i>	31
2.1.4.2. <i>Índice de refracción</i>	31
2.1.4.3. <i>Actividad óptica</i>	31
2.1.5. Determinación de la composición química del aceite esencial.....	32
2.1.5.1. <i>Cromatografía de gases</i>	32
2.1.5.1.1. <i>Preparación de la muestra</i>	32
2.1.5.1.1.1. <i>Corrida cromatografía en la columna DB-5MS acoplada a espectrometría de masas</i>	33
2.1.5.1.1.2. <i>Corrida cromatografía en la columna HP-INNOWAX acoplada a espectrometría de masas</i>	34
2.1.5.1.1.3. <i>Corrida cromatografía en la columna DB-5MS acoplada al detector de ionización en llama</i>	35
2.1.5.1.2. <i>Identificación de los compuestos químicos</i>	36
2.1.6. Determinación de la actividad biológica.....	37
2.1.6.1. <i>Actividad Antibacteriana</i>	38
2.1.6.1.1. <i>Preparación del cultivo microbiano “cultivo overnight”</i>	38
2.1.6.1.2. <i>Preparación de la suspensión del inóculo bacteriano</i>	38
2.1.6.1.3. <i>Procedimiento</i>	38
2.1.6.2. <i>Actividad Antifúngica</i>	39
2.1.6.2.1. <i>Preparación de la suspensión de los inóculos fúngicos</i>	39
2.1.6.2.1. <i>Procedimiento</i>	39
CAPITULO III	40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
3.1. Recolección del material vegetal.....	41
3.2. Determinación de la humedad.....	41
3.3. Determinación del rendimiento.....	42
3.4. Determinación de las propiedades físicas del aceite esencial.....	43
3.4.1. Densidad del aceite esencial.....	43
3.4.2. Índice de refracción del aceite esencial.....	44

3.4.3. Actividad óptica específica del aceite esencial.....	45
3.5. Compuestos químicos del aceite esencial de <i>T. terniflora</i>	46
3.5.1. Análisis cualitativo y cuantitativo.....	46
3.6. Análisis de actividad biológica de <i>T. terniflora</i>	53
3.6.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	53
CONCLUSIONES.....	56
RECOMENDACIONES.....	57
BIBLIOGRAFÍA.....	58

ANEXOS.....	62
ANEXO I.....	63
DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD RELATIVA.....	63
ANEXO II	64
DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO.....	64
ANEXO III.....	65
DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA A 20 °C.	65
ANEXO IV.....	68
DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN.....	68
ANEXO V.....	71
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ÓPTICA.....	71
ANEXO VI.....	75
INDICE DE KOVATS.....	75
ANEXO VII.....	76
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS INDICE DE KOVATS.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema básico del equipo de hidrodestilación.....	8
Figura 2. Diagrama básico de un cromatógrafo de gases.....	11
Figura 3. Especie, <i>Tagetes terniflora</i>	26
Figura 4. Esquema del proceso investigativo.....	28
Figura 5. Cromatógrafo de gases.....	32
Figura 6. Condiciones operacionales para la corrida cromatográfica en la columna no polar DB-5MS.....	33
Figura 7. Condiciones operacionales para la corrida cromatográfica en la columna polar HP-INNOWAX.....	34
Figura 8. Condiciones operacionales para la corrida cromatográfica en la columna no polar DB-5MS acoplada al detector de ionización en llama CG-FID.....	35
Figura 9. Cromatograma del aceite esencial de <i>T. terniflora</i> en la columna no polar DB-5MS.....	46
Figura 10. Cromatograma del aceite esencial de <i>T. terniflora</i> en la columna polar HP-INNOWAX.....	47
Figura 11. Compuestos mayoritarios en la columna no polar DB-5MS.....	50
Figura 12. Compuestos mayoritarios en la columna polar HP-INNOWAX.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Tagetes terniflora</i>	26
Tabla 2. Kg de muestra recolectada por salida de campo.....	41
Tabla 3. Porcentaje de humedad.....	41
Tabla 4. Porcentaje de rendimiento.	42
Tabla 5. Densidad relativa del aceite esencial <i>T. terniflora</i>	43
Tabla 6. Índice de refracción del aceite esencial <i>T. terniflora</i>	44
Tabla 7. Actividad óptica del aceite esencial <i>T. terniflora</i>	45
Tabla 8. Composición química del aceite esencial de <i>T. terniflora</i> en la columna no polar DB-5MS.....	48
Tabla 9. Composición química del aceite esencial de <i>T. terniflora</i> en la columna polar HP-INNOWAX.....	49
Tabla 10. Composición de la cantidad relativa (%) de los compuestos químicos del aceite esencial de <i>T. terniflora</i> en la columna DB-5MS y HP-INNOWAX.....	52
Tabla 11. Resultados para el CMI de <i>T. terniflora</i>	54

RESUMEN

Tagetes terniflora es una hierba de tipo ruderal, crece entre los 2000 y 3500 m.s.n.m., el aceite esencial fue extraído de sus partes aéreas por el método de hidrodestilación. La composición química del aceite esencial se determinó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas CG/MS y al detector de ionización de llama CG/FID. La actividad biológica fue evaluada por el método de microdilución en caldo. Se identificaron 9 compuestos que representan el 93.56% del aceite. Los componentes mayoritarios fueron: Z-Ocimenene (49.80%), Dihydrotagetone (11.85%), E-Ocimenone (11.12%), E-Tagetone (6.68%) y β -Ocimene (5.13%). La densidad fue de 0.9398 g/cm³, el índice de refracción de 1.5142 y la actividad óptica de -0.3415°. El aceite esencial mostro inactividad frente a cepas Gram-positivas y Gram-negativas con un CMI de 2000 μ g/mL, sin embargo, se evidenció una moderada actividad biológica frente a hongos a la misma concentración utilizada para microorganismos.

PALABRAS CLAVES: *Tagetes terniflora*, Aceite esencial, Composición Química, Actividad biológica.

ABSTRACT

Tagetes terniflora is a ruderal herb, grows between 2000 and 3500 m, the essential oil was extracted from its aerial parts by the hydrodistillation method. The chemical composition of the essential oil was determined by gas chromatography coupled to CG/MS mass spectrometry and the CG/FID flame ionization detector. The broth microdilution method evaluated the biological activity. We identified 9 compounds that represent 93.56% of the oil. The major components were: Z-Ocimenene (49.80%), Dihydrotagetone (11.85%), E-Ocimenone (11.12%), E-Tagetone (6.68%) and β -Ocimene (5.13%). The density was 0.9398 g/cm³, the refractive index of 1.5142 and the optical activity of -0.3415°. The essential oil showed inactivity against Gram-positive and Gram-negative strains with an MIC of 2000 μ g/mL, however, a moderate biological activity against fungi at the same concentration used for microorganisms was evidenced.

KEY WORDS: *Tagetes terniflora*, Essential oil, Chemical composition, Biological activity.

INTRODUCCIÓN

El presente estudio consiste en la extracción, caracterización física y química, y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de la especie conocida como chilchi (*tagetes terniflora*) de la provincia de Loja. Se desarrolla en tres capítulos, el primero titulado Marco Teórico, en el cual se describe el estado del arte del tema; el capítulo segundo donde se expone la metodología utilizada para llevar a cabo la investigación y en el capítulo tercero se analiza y discute los resultados obtenidos.

Esta investigación contribuye al estudio de la flora aromática de la Región Sur del Ecuador, pues, en la actualidad, el gran desafío para los países ricos en biodiversidad es poder obtener la mayor cantidad de información sobre sus recursos naturales, más aún, si tenemos en cuenta que una de cada cinco especies vegetales conocidas en el mundo se encuentra en peligro de extinción; como lo reporta la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) (Sanz, 07/11), hecho que no se aparta de la realidad del Ecuador, donde 1164 especies de plantas están incluidas en la “Lista Roja”, como se registra en el Libro Rojo de las Plantas endémicas del Ecuador (Valencia, 2000), lo que es realmente alarmante para un país como el nuestro, por ser considerado como una zona extremadamente importante para la conservación de la biodiversidad vegetal (Arteaga, 2011). Razón por la cual, el Área de Aceites Esenciales de la Universidad Técnica Particular de Loja pone especial énfasis en realizar este tipo de investigación y, de esta manera lograr contribuir a la conservación de diversas especies vegetales así como obtener información importante sobre sus principios activos, concentraciones e identificar también sus usos alternativos (L. Rivera & Solano, 2009), ya que muchas de las plantas de nuestra provincia han mostrado tener uso ornamental, medicinal y alimenticio.

El objetivo general es desarrollar el estudio de aceites esenciales provenientes de especies vegetales, identificando los componentes químicos, propiedades físicas y actividad biológica presente en la especie en estudio. La investigación en este sentido brinda la oportunidad de encontrar nuevos agentes activos (sustancias químicas vegetales) que pueden considerarse fármacos con fines terapéuticos desde el punto de vista farmacológico (Aricapa, 2009). Contribución que es muy importante si tenemos en consideración que estas sustancias se pueden conseguir a partir de una fuente de materia prima económica y natural, las plantas medicinales. La manera más aplicada y sencilla

para estudiar y determinar las sustancias activas de una planta es a través de la obtención de extractos vegetales (González, 2004). Extractos que se pueden obtener de diferentes maneras, pero las dos técnicas más utilizadas son: Extracción con agua por destilación con arrastre de vapor y la extracción con solventes orgánicos.

En la presente investigación se estudia los componentes volátiles de *Tagetes terniflora*, mediante la técnica de hidrodestilación, que consiste en obtener el aceite esencial de una planta aromática mediante el uso de vapor saturado a presión atmosférica (Rios, Giraldo, León, & Moreno, 2008). Para lo cual se inició con la recolección de la planta, preparación pos cosecha y posterior destilación. Al aceite obtenido se le determino la densidad relativa según la norma AFNOR NF T75-111 (ISO 279:1998), el índice de refracción mediante la norma AFNOR NF 75-112 (ISO 280:1998).

Para el análisis del aceite esencial se usa la técnica de cromatografía de gases, que nos permite separar los componentes de una muestra en virtud de que éstos se distribuyen entre una fase gaseosa móvil y una fase estacionaria líquida o sólida contenida en una columna. Esta técnica de análisis ofrece resoluciones excelentes con sensibilidad del orden de miligramos a picogramos, a tal efecto se pueden emplear diferentes detectores, algunos de ellos universales, mientras otros resultan ser más selectivos y responden únicamente a algunos de los componentes de una mezcla. Con este fin, se puede usar la espectrometría de masas, la cual proporciona un espectro característico de cada molécula y al ser acoplada a la cromatografía de gases puede resultar un detector muy útil para la cuantificación de sustancias orgánicas (D. Rivera, 2008).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada por el método de microdilución en caldo usando una concentración de 5×10^5 cfu/mL para bacterias Gram-negativas [*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC9997), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2)] y bacterias Gram-positivas [*Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)], y una concentración de 5×10^4 esporas/mL para hongos dermatofitos [*Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185)].

CAPITULO I
MARCO TEORICO

1.1. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son sustancias odoríferas de naturaleza oleosa, muy volátiles y poco densos; corresponden al producto del metabolismo secundario de la planta, en cuya composición interviene una proporción de hidrocarburos de la serie polimetilénica del grupo de los terpenos que responden a la fórmula $(C_5H_8)_n$ junto con otros compuestos casi siempre oxigenados (alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y compuestos fenólicos) (Flores, 2010).

Se encuentran prácticamente en casi todos los vegetales, y se pueden extraer de diferentes partes del mismo vegetal, más explícitamente de todos los lugares donde presente estructuras histológicas especializadas; frecuentemente localizadas sobre, o, en la proximidad de la superficie de la planta: células oleíferas, conductos o cavidades secretoras, o en pelos glandulosos (López Luengo, 2004). Pueden, asimismo, estar depositados en tejidos específicos como: las hojas, en las raíces, en el pericarpio del fruto, en las semillas, en el tallo, en las flores y en los frutos (Martínez, 1996).

La mayoría de los aceites esenciales son líquidos, fluidos y de color amarillo claro, aunque en algunos casos debido a la presencia de hidrocarburos azulénicos, poseen un color azulado. Algunos productos naturales odoríferos obtenidos de ciertas plantas son similares en su composición química a la de los aceites esenciales y también evocan el olor de la planta. Sin embargo, tienen una consistencia bastante viscosa y tienden a polimerizarse, por lo que reciben el nombre de oleorresinas (Stashenko, 2009).

Debemos tener en cuenta que los aceites esenciales desprenden olores agradables, aunque en algunos casos el olor puede ser relativamente desagradable, casos en los cuales poseen compuestos azufrados en su composición. Los responsables del aroma de los aceites esenciales suelen ser sustancias que se encuentran en proporciones traza y determinan el perfil individual y la huella aromática propia de cada aceite esencial. Se trata de compuestos con grupos funcionales del tipo: cetona, éster, alcohol, aldehído, éter, etc., sustancias que en su estado puro presentan un aroma característico, en ocasiones recuerda al de determinadas frutas o a olores peculiares, pero en conjunto determinan el aroma y las propiedades de los aceites esenciales (Sánchez, 2006).

En general, los Aceites Esenciales se definen como mezclas de componentes volátiles, productos del metabolismo secundario de las plantas. Se encuentran muy difundidos en el reino vegetal; de las 295 familias de plantas, de 60 a 80 producen aceites esenciales. Las principales plantas que contienen aceites esenciales, se encuentran en familias como: compuestas, labiadas, lauráceas, mirtáceas, rosáceas, rutáceas, umbelíferas, pináceas (NaturAEsen, 2006).

1.1.1. Extracción.

La extracción de aceites esenciales a partir del material vegetal se puede lograr mediante diferentes métodos. Para cada método puede haber muchas variaciones y refinamientos. La elección del método de extracción dependerá de la naturaleza del material, la estabilidad de los componentes químicos y la especificación del producto objetivo.

Destilación por arrastre con vapor de agua, hidrodestilación: La Destilación por arrastre de vapor sigue siendo el método más económico y sencillo a la hora de extraer aceites de especies y material vegetal aromático. La ventaja principal de la destilación es que generalmente puede llevarse a cabo con un poco de equipo muy simple y cerca de la localización de la planta de producción, además, la calidad del aceite tiene el mayor potencial para ser modificado debido a los efectos de calentamiento directo y el contacto con el agua, sin embargo, a pesar de ser uno de los más baratos, se debe considerar que el tiempo empleado durante esta extracción es bastante amplio. Este método consiste en colocar el material vegetal sobre una rejilla perforada que se inserta encima de la base del tanque del destilador para evitar que el material colocado en la parte inferior este en contacto directo con la base calentada. Con el calor y vapor generados al interior del equipo se va arrastrando los metabolitos secundarios, que posteriormente se condensan y son recogidos (Douglas, Heyes, & Smallfield, 2005).

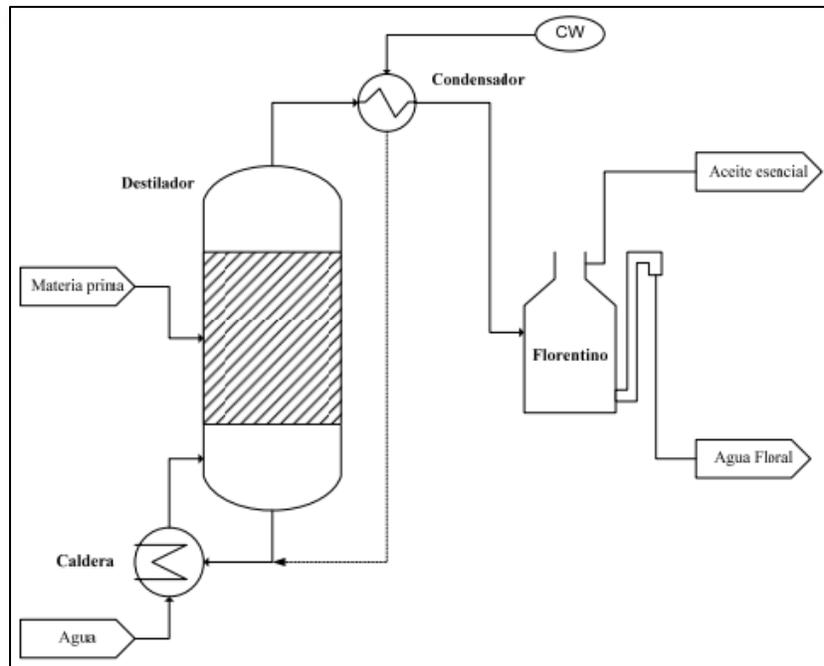


Figura 1. Esquema básico del equipo de hidrodestilación.

Fuente: Chávez, 2007.

Elaboración: Chávez, 2007.

Existen otros métodos alternativos que se pueden utilizar a la hora de extraer aceites esenciales; muchos de estos muestran ventajas reduciendo los tiempos de extracción y el consumo de energía, aunque, en algunos casos es necesario un costo elevado y mayor investigación.

Prensado: El material vegetal es exprimido mecánicamente para liberar el aceite. Luego es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para la extracción de esencias cítricas (Peredo-Luna, Palou-Garcia, & López-Malo, 2009).

Extracción con solventes volátiles: La muestra seca y molida se pone en contacto con solventes como alcohol o cloroformo. Estos compuestos solubilizan el aceite esencial, pero también extraen otras sustancias como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura. Se utiliza a escala de laboratorio, pues a nivel industrial resulta costoso por el alto valor comercial de los solventes y porque se obtienen esencias mezcladas con otras sustancias (Peredo-Luna et al., 2009).

Método de enflorado: El material vegetal (generalmente flores) se pone en contacto con una grasa. La esencia es solubilizada en la grasa que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla (el concreto) de aceite esencial y grasa la cual es separada posteriormente por otros medios físico - químicos. En general se recurre al agregado de alcohol caliente a la mezcla y su posterior enfriamiento para separar la grasa (insoluble) y el extracto aromático (absoluto) (Peredo-Luna et al., 2009).

Extracción con fluidos supercríticos: Es el desarrollo más reciente. El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un fluido en estado supercrítico (por ejemplo, CO₂). Las esencias son así solubilizadas y arrastradas mientras que el fluido supercrítico, que actúa como solvente extractor, se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente. Finalmente se obtiene una esencia cuyo grado de pureza depende de las condiciones de extracción (Peredo-Luna et al., 2009).

1.1.2. Clasificación.

Los aceites esenciales se pueden clasificar por dos criterios: Por su consistencia y por su origen. Dentro de los primeros se encuentran los aceites Fluidos, Bálsamos y Oleorresinas. En las del segundo tipo tenemos de carácter natural, artificial y sintético (Rodríguez-Álvarez, Alcaráz-Meléndez, & Real-Cosío, 2012).

Consistencia.

- *Fluidas:* Son líquidos volátiles a temperatura ambiente.
- *Bálsamos:* Son de consistencia más espesa, poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización.
- *Oleorresinas:* Tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas.

Origen.

- *Naturales:* Se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosos.
- *Artificiales:* Se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes.

- *Sintéticos*: como su nombre lo indica son los producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes.

1.1.3. Caracterización.

Los aceites esenciales son volátiles, líquidos a temperatura ambiente, traslucidos y de color amarillo, poseen una densidad menor a la del agua. Además, debido a que en su composición existen productos ópticamente activos, refractan la luz polarizada. Son muy solubles en alcoholes y disolventes orgánicos (éter, cloroformo), alta en soluciones como el etanol y en algunos casos en el agua, pero, son extraídos y transportados por el vapor de agua (Luna, 2007).

Actualmente se han identificado alrededor de cuatrocientos componentes químicos constituyentes de los aceites esenciales, de manera casi exclusiva la mayoría pertenecen a grupos característicos: el grupo de los terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos), el grupo de los compuestos derivados del fenilpropano, los terpenos originarios del ácido acético, los terpenos provenientes del ácido shikímico (aromáticos) y otros como los compuestos procedentes de la degradación de terpenos (González, 2004).

1.1.3.1. Cromatografía de gases.

Es un método usado ampliamente para la separación de los componentes volátiles y semivolátiles de una muestra. La combinación de altas resoluciones, sensibilidad y tiempos de análisis cortos la ha convertido en una técnica de rutina usada en la mayoría de los laboratorios químicos, tiene la ventaja de disponer de detectores mucho más universales (por ejemplo, el de ionización de llama). Sin embargo, en cromatografía de gases, la influencia de la temperatura sobre la distribución del equilibrio es considerable, Por esta razón, la cromatografía de gases se emplea cuando los componentes de la mezcla problema son volátiles o semivolátiles y térmicamente estables a temperaturas de hasta 350 - 400 °C.

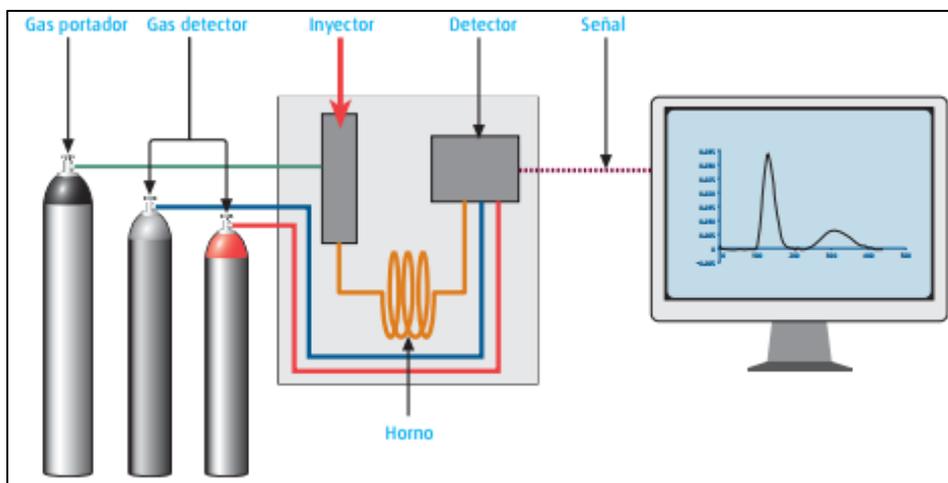


Figura 2. Diagrama Básico de un cromatógrafo de gases.

Fuente: Abello Linde, 2010.

Elaboración: Abello Linde, 2010.

A menudo la cromatografía de gases se emplea para confirmar la presencia o ausencia de un compuesto en una muestra determinada, sin embargo, también se la utiliza para establecer la cantidad de componentes individuales presentes en una muestra, para esto se pueden emplear diferentes detectores basados generalmente en la medida de una determinada propiedad física de los componentes a analizar. En este sentido, la espectrometría de masas acoplada a la cromatografía de gases puede resultar un detector universal para la cuantificación de sustancias orgánicas. Puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente. Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, GC (“Gas Chromatography”) y MS (“Mass Spectrometry”) da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas (Gutiérrez & Droguet, 2002).

1.1.4. Propiedades.

Desde la antigüedad, debido a las particularidades que presentan los aceites esenciales se han empleado en preparaciones culinarias como saborizantes y aromatizantes o como

conservantes de alimentos, en otros casos para detener, prevenir o inhibir el deterioro oxidativo y los daños causados por bacterias, hongos u otros (Vargas & Bottia, 2008).

Con el paso del tiempo y con la ayuda de nuevas técnicas de análisis se logró determinar que las propiedades físicas (volatilidad, densidad, difusión a temperatura ambiente, etc.) y las propiedades químicas (grupos funcionales como: alcoholes, aldehídos, ésteres, cetonas, terpenos, etc.) son los responsables de los principios activos del aceite esencial y de sus propiedades terapéuticas, por lo tanto, cada aceite es diferente, y dependiendo de las características que presente cada uno se les puede dar un uso específico (Tepe, Daferera, Sokmen, Sokmen, & Polissiou, 2005). De esta manera, y debido a la creciente presión de los consumidores, las industrias están reemplazando los productos sintéticos por sustancias de origen natural (aceites esenciales). Por tal motivo, el conocimiento de las actividades antimicrobianas, antioxidantes y citotóxicas son importantes para la aplicación de los aceites esenciales en las diferentes industrias (Albarracín H., Alfonso A., & Sánchez B., 2012).

1.1.5. Usos y aplicaciones.

Debido a las cualidades que muestran los aceites esenciales suelen ser usados como materias primas o como insumos industriales. En la industria de fragancias son muy utilizados, para acentuar las notas de perfumes, aguas de perfume, aguas de tocador, aguas de colonia, aguas frescas y aguas de baño. Se emplean en cosmética para hacer jabones, champús, desodorantes, labiales, cremas, ungüentos, pastas dentales, etc., para lo cual se basan en las funciones específicas que algunas esencias muestran sobre la piel; de esta manera, se hacen productos más agradables, atractivos y que tengan una identidad única. Se usan en la industria de productos de limpieza, para elaborar insumos para pisos, baños, cocinas, etc., otorgándoles olores agradables. En la industria de los plásticos se usan para enmascarar el mal olor que tienen algunos cauchos y plásticos. En la manufactura de textiles y de pinturas se usa como enmascaradores de olores. En la papelería, para impregnar fragancias a cuadernos, esquelas, tarjetas, papel higiénico, toallas higiénicas, etc. Asimismo, en la industria de la alimentación, licorería y confitería se suelen utilizar como aromatizantes, saborizantes y condimentos. Algunos se utilizan en la industria farmacéutica para la obtención de diversos principios activos (anetol, eugenol) o como excipientes y aromatizantes en la preparación de jarabes, suspensiones, elixires, etc.

Finalmente en la industria química son aplicados como bactericidas, insecticidas y disolventes; y en las petroquímicas los terpenos de los aceites esenciales son usados como vehículos de flotación y lubricantes (Flores, 2010).

En la actualidad se ha abierto otro campo de utilidad para los aceites esenciales, la denominada aromaterapia, la cual es una disciplina dentro de la medicina natural que emplea básicamente aceites esenciales en sus tratamientos terapéuticos. Cabe mencionar, que con estas prácticas terapéuticas se debe tener especial cuidado ya que, a pesar de que los aceites esenciales son considerados en el ámbito popular como productos naturales poco peligrosos pueden ser muy perjudiciales, por ende, fácilmente puede darse una sobredosificación al aplicar aceites que contengan componentes tóxicos y que puedan atravesar la barrera hematoencefálica y a su vez afectar al sistema nervioso central (López Luengo, 2004). Para este ámbito, los aceites esenciales, se pueden aplicar por vía oral para el tratamiento de: Catarros y resfriados, flatulencias, indigestiones, estreñimiento, diarreas, dolores de cabeza y menstruaciones dolorosas, piedras en el riñón o vías urinarias. Para las personas que no pueden tomar medicamentos o por condicionantes del sabor de los aceites esenciales no puedan consumirlos por vía oral, se los puede administrar a través de inhalaciones; de esta manera se pueden tratar problemas relacionados con: Tensión, disfunción del sistema respiratorio, senos paranasales congestionados, dolor de cabeza, dolor de garganta y catarro. Otra técnica es a través del baño, de esta forma se aspira el vapor de los aceites y se permite que estos penetren a través de la piel, son usados comúnmente para el tratamiento de: Insomnio, tensión nerviosa, disfunciones musculares, problemas circulatorios, problemas menstruales, catarro, resfriados, dolor de cabeza, retención de líquidos, etc. Por último, para el tratamiento de Problemas cutáneos, neuralgias, contusiones, heridas abiertas, menstruaciones dolorosas, esguinces y dolores musculares se puede aplicar compresas calientes con aceite esencial diluido en agua (Buckle, 2014; Lawless, 2013).

1.2. Actividad Biológica.

Con el aumento de la resistencia de los patógenos frente a los medicamentos comerciales, se ha generado un interés considerable sobre la investigación de los aceites esenciales como agentes antimicrobianos, antifúngicos o antivirales. La acción que realizan los aceites en este sentido se les atribuye a una sinergia entre todos sus componentes. Pues, una

característica importante que presentan los aceites esenciales es su hidrofobicidad, lo que les permite adherirse a la membrana celular bacteriana, y, a través de ejercer una presión sobre esta, logra hacerla más permeable, de esta manera ocasionan la fuga de iones del interior de la célula por alteración de la fuerza motriz de los protones y el flujo de electrones. Los daños a la pared y la membrana de la célula ocasionan la fuga de macromoléculas y por consiguiente la lisis. En general, el efecto antimicrobiano se debe principalmente a la presencia de fenoles, aldehídos y alcoholes (Rueda, Conde, & Lengua, 2013).

Por todo lo antes mencionado, hoy en día se está poniendo especial énfasis en la investigación sobre las propiedades anticancerígenas y antioxidantes de los aceites esenciales, así como sus efectos antivirales y antinociceptivos. Un campo muy prometedor para el área de aceites esenciales es sobre todo su aplicación contra tumores. Las propiedades anticancerígenas mostradas por los metabolitos secundarios van ganando ganado cada vez más interés en todo el mundo, puesto que es una terapia "natural". Uno de los compuestos más destacados en ese sentido es el d-limoneno, el principal constituyente del aceite esencial de naranja dulce, así como de otros cítricos; el alcohol perílico, que de acuerdo con estudios realizados en roedores se ha determinado que puede ser un candidato quimioterapéutico eficaz contra el cáncer.

Los aceites esenciales están viendo la luz como medio de tratamiento del dolor neuropático causado por el daño de nervios periféricos, una problemática clínica de difícil solución para una significativa proporción de pacientes, debido a que este tipo de dolor es en general refractario a los tratamientos farmacológicos tradicionales. Algunos compuestos de los aceites como la timoquinona están mostrando efectos antinociceptivos ante esta problemática. Finalmente, debemos mencionar, que algunos aceites extraídos de plantas pertenecientes a la familia Asteraceae están siendo utilizados como medio de tratamiento contra algunos virus, ya que, son capaces de inhibir su replicación y pueden prevenir la propagación desde una célula a otra (Gerhard, 2009).

1.2.1. Bacterias.

Son estructuras unicelulares extremadamente pequeñas, pueden llegar a medir entre 0,2 y 5 μm . Se reproducen por un proceso asexual denominado fisión binaria, los cuales forman el exterior y el interior del microorganismo. Las bacterias tienen formas características

variadas: redondas o elipsoidales tales como *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus*; varillas, como *Bacillus* y especies de *Clostridium*; largos, como las especies de *Actinomyces*; y las células en forma de coma y espirales, como *Vibrio cholerae* y *Treponema pallidum*, respectivamente. En su estructura presentan un compuesto llamado peptidoglicano, el cual les confiere una capacidad de tinción, y que se utiliza para poderlas estudiar dentro de dos grupos, como bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas (Baron, 1996).

Las bacterias Gram-positivas tienen una pared celular gruesa formada de varias subcapas, y su principal componente es el peptidoglicano. Una característica importante del peptidoglicano es que es suficientemente poroso y permite que gran parte de los metabolitos lleguen a la membrana citoplasmática. En tanto que las Gram-negativas poseen paredes celulares más complejas, contiene dos capas exteriores con relación a la membrana citoplasmática, inmediatamente después de la membrana hay una capa delgada de peptidoglicano, el espacio entre este medio y la membrana plasmática es el espacio periplásmico. Este espacio tiene enzimas hidrolíticas que degradan macromoléculas necesarias para la célula. Por otro lado, la membrana externa es hidrófoba y funciona como una barrera para las grandes moléculas. La zona exterior está generalmente formada por lipopolisacárido (LPS), que también puede ser conocido como endotoxina, y es la causante de la respuesta inmune de la célula. La membrana externa se une a la membrana citoplasmática a través de área de adhesión y peptidoglicano por la interacción con una lipoproteína (Lucana Nina & Huanca Espinoza, 2014).

1.2.1.1. Bacterias Gram-positivas.

- ***Staphylococcus aureus***

Es una bacteria Gram-positiva del tipo anaerobio, se cultiva fácilmente en medios convencionales a 37,8 °C y se desarrolla después de 24 horas de incubación. El *S. aureus* segrega numerosas enzimas y toxinas que, junto con las estructuras internas de la célula, generan la patogénesis de las infecciones concomitantes. El *S. aureus* es un colonizador frecuente de la piel y las mucosas, en principio la colonización comienza en la mucosa nasal, desde donde las bacterias pueden propagarse a las manos y el aire, y ser transmitido a las personas susceptibles a este microorganismo. El *S. aureus* es con frecuencia el

patógeno causante de infecciones nosocomiales, infecciones urinarias agudas, disuria en mujeres jóvenes y casos de uretritis en los hombres sexualmente activos. La medida preventiva más importante es el lavado de manos y entre otras tenemos la aplicación intranasal de antibióticos (Kayser, Bienz, Zinkernagel, & Eckert, 2005).

- ***Enterococcus faecalis***

La mayoría de las infecciones producidas por enterococo son causadas por *Enterococcus faecalis*. Se encuentran entre los principales patógenos nosocomiales, presenta resistencia intrínseca a la mayoría de los antibióticos y una moderada sensibilidad a las penicilinas, son resistentes a todas las cefalosporinas y a concentraciones terapéuticas de aminoglucósidos y clindamicina. Son capaces de proliferar en 45,8 °C en presencia de 6,5% de NaCl y a un pH de 9 (Cercenado, 2011; Kayser et al., 2005).

1.2.1.2. Bacterias Gram-negativas.

- ***Pseudomona aeruginosa***.

Es un bacilo Gram-negativo del tipo aerobio, considerado como un patógeno oportunista. Es un microorganismo altamente versátil, capaz de tolerar condiciones bajas de oxígeno. Puede sobrevivir con bajos niveles de nutrientes y crecer en rangos de temperatura de 4 a 42 °C. Estas características le permiten adherirse y sobrevivir en equipos médicos y en otras superficies hospitalarias, lo que favorece el inicio de infecciones nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos. Tienen una longitud aproximada de 1 a 3 µm de largo y 0,5 a 1,0 µm de ancho. Pueden producir un pigmento (la pioverdina) que da un color verde amarillento o marrón amarillento. La mayoría de los estudios indican que una tasa de mortalidad atribuible a infecciones por PAE es de aproximadamente el 34% (Lloria, 2009; Ochoa et al., 2013).

P. aeruginosa puede causar neumonías, infecciones del tracto urinario y bacteriemias, así como una alta morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística, debido a las infecciones crónicas que eventualmente conducen a un daño a nivel pulmonar e insuficiencia respiratoria. Las infecciones por PAE son difíciles de erradicar debido a su elevada resistencia intrínseca a los antibióticos, además de su capacidad para adquirir

nuevos niveles de resistencia a diferentes anticuerpos (Ochoa et al., 2013). Entre las medidas básicas de prevención se incluyen: el lavado de las manos, el control de equipos estériles y uso de desinfectantes, la limpieza de áreas físicas y la prevención de sepsis en trabajadores de la salud (Lebeque Pérez, Morris Quevedo, & Calás Viamonte, 2006).

- ***Klebsiella pneumoniae.***

Es la especie de mayor importancia clínica y más estudiada dentro del género *Klebsiella*. Corresponde a un bacilo Gram-negativo, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, es de tipo anaerobia, inmóvil y usualmente encapsulada, ampliamente esparcida en el ambiente, y se presenta de manera especial en las superficies mucosas de mamíferos; en los seres humanos se coloniza en la nasofaringe y el tracto gastrointestinal. Los principales reservorios para la transmisión de la bacteria en el ambiente hospitalario son el tracto gastrointestinal de los pacientes y las manos del personal al cuidado de ellos. La *K. pneumoniae* es la responsable de provocar infecciones del tracto urinario y neumonía en personas sin enfermedades de base. Es causa además de bacteriemia, infecciones del sitio quirúrgico, infecciones del tracto biliar, peritonitis y meningitis (Echeverri Toro & Cataño Correa, 2010; López Vargas & Echeverri Toro, 2010).

- ***Proteus vulgaris.***

Es una bacteria Gram-negativa con forma de varilla. El tamaño de las células individuales varía entre 0,4 - 1,2 y 0.6 μm por 2.5 μm . *P. vulgaris* es activamente móvil; habita en el suelo, en el agua contaminada, en la carne cruda, en el tracto gastrointestinal de los animales, y en el polvo. En los seres humanos causan graves abscesos e infecciones del tracto urinario, producen bacteriemia, neumonía y lesiones focales en pacientes débiles o en los que reciben infusiones intravenosas y se asocia con la infección nosocomial (Brooks, Carroll, Butel, Morse, & A, 2011; Ghaidaa, Yanchang, & Abdallah, 2013).

- ***Escherichia coli.***

Este microorganismo tiene forma de bastón, pertenece a la familia Enterobacteriaceae, por lo general mide de 1 - 3 μm de largo y 0,5 μm de diámetro, la mayor parte de estas bacterias son móviles. Pueden fermentar la lactosa y son capaces de producir indol a partir de

triptófano. En cuanto a las patologías causadas por *E. coli* encontramos: que es una de las causantes más frecuentes de deshidratación por diarrea en niños menores de dos años y neonatos, además, la principal causa de diarrea en personas que viajan constantemente a diferentes lugares, en especial hacia regiones y países con condiciones de higiene deficientes. Algunas cepas de *E. coli* pueden producir toxinas las cuales pueden causar enfermedad de grado variable como diarrea acuosa, diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica, síndrome hemolítico urémico y muerte. *E. coli* es la causa más frecuente de infección urinaria, infecciones respiratorias, infecciones del SNC. También se han encontrado cepas de *E. coli* en casos de artritis séptica, endoftalmitis, tiroiditis supurada, abscesos intraabdominales, peritonitis bacteriana espontánea, abscesos hepáticos, abscesos cerebrales, endocarditis, osteomielitis, prostatitis, sinusitis, tromboflebitis séptica y otras enfermedades (Puerta-García & Mateos-Rodríguez, 2010).

- ***Salmonella typhimurium.***

Pertenece a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos Gram-negativos, no formadores de esporas, anaerobios, provistos de flagelos y móviles. Se alojan en el tracto gastrointestinal del ser humano, por lo tanto, una fuente de contagio es a través de las heces fecales. Son causa frecuente de gastroenteritis, además de producir otras infecciones, como por ejemplo: bacteriemias en pacientes inmunodeprimidos por el VIH (Brooks et al., 2011; Jurado, Muñoz, Delgado, Rivero, & Cisneros, 2010).

1.2.2. Hongos.

El reino de los hongos comprende más de 50000 especies diferentes y, alrededor de 200 han sido identificados como patógenos humanos. Sólo alrededor de una docena de estas especies "patógenos" causa el 90% de todas las micosis humanas. Muchas infecciones micóticas son relativamente inofensivas, por ejemplo: las dermatomicosis, pero en los últimos años, el número creciente de pacientes con diversos tipos de defectos inmunes han dado lugar a más micosis que amenazan la vida (Kayser et al., 2005).

Los hongos son microorganismos eucarióticos, con un tamaño tubular de 2 a 10 μm de ancho. El elemento morfológico básico de los hongos es la hifa y a su vez una red de hifas entrelazadas forma un micelio. Los hongos se reproducen asexualmente por mitosis, por el

crecimiento de las hifas o con la ayuda de esporas asexuales, en la reproducción sexual (meiosis), por otra parte, produce esporas sexuales.

Trichophytum rubrum.

Trichophyton rubrum (*T. rubrum*) es un dermatofito que tienen la capacidad de invadir los tejidos queratinizados del cuerpo, y es el responsable de causar la mayoría de las infecciones fúngicas superficiales en todo el mundo. Este grupo de hongos puede causar infección en cualquier parte sobre la piel, más comúnmente en los pies, la región inguinal, las axilas, el cuero cabelludo y las uñas. Sin embargo, las enfermedades más habituales de la piel humana por este hongo son: tinea pedis, tinea cruris y tinea corporis (Blutfield, Lohre, Pawich, & Vlahovic, 2015).

- ***Trichophytum mentagrophytes.***

Es un hongo de distribución mundial, produce colonias de color blanco o crema, con una superficie pulverulenta o aterciopelada, que con el tiempo se hace café rojizo. Su importancia clínica se debe a que es antropofílico, causando con frecuencia tiña en los pies, tiña del cuerpo y algunas veces invasión superficial de la uña. No se sabe que invada el pelo in vivo, pero, produce perforaciones del mismo in vitro. Tiene un amplio rango de huéspedes animales, incluyendo ratones, perros, canguros, gatos, caballos, ovejas y conejos. Produce lesiones inflamatorias en la piel y se puede transmitir a la piel cabelluda de los humanos (Fernández, Segundo, Arenas, Silva, & Guzmán, 2002).

1.3. Plantas medicinales.

Las plantas son universalmente reconocidas como una parte transcendental del mundo natural y un recurso esencial para el planeta. Pues, su uso es una práctica que existe desde los inicios de la especie humana y sus derivados siempre han mostrado efectos controladores contra ácaros, roedores, nematodos, bacterias, virus, hongos e insectos; además, constituyen un elemento vital para la sustentabilidad global del hombre para suplir necesidades básicas como alimento, medicina, vivienda y vestido. Así mismo, juegan un papel clave en el mantenimiento del medioambiente y la estabilidad de los ecosistemas (Blackmore et al., 2000)

El uso de las plantas con fines medicinales se remonta hacia 3000 años antes de Cristo, fecha que se tiene reporte del libro más antiguo sobre las plantas medicinales, además, se conoce que los sumerios hacia 2500 años a.C., usaron las plantas con fines curativos (Alarcón, 2011).

Una planta medicinal puede definirse como una especie vegetal que elabora metabolitos secundarios, llamados principios activos, 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 las enfermedades, dolores o restablezca la salud perdida (García-Nieto, 2000). Su aprovechamiento sin duda comenzó con la continua experimentación de materiales vegetales diversos, que de acuerdo a sus características únicas ofrecían agradables aromas, alivio del dolor y cura de malestares (Juárez-Rosete et al., 2013).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que el 80% de la población mundial utilizan las plantas medicinales para su atención primaria de salud, especialmente en países en vías de desarrollo donde cientos de millones de personas dependen de las plantas para sus sistemas de medicina tradicional y ancestral. Sin embargo, el vertiginoso desarrollo de la industria farmacéutica en la centuria pasada trajo como consecuencia, una notable disminución en el uso de las plantas medicinales, por lo que, en la actualidad se hacen grandes esfuerzos para rescatar este conocimiento y canalizarlo hacia la población de escasos recursos económicos (Blackmore et al., 2000; Celis et al., 2008; Flores Guido, Flores Abuxapqui, & Pérez Mutul, 2009).

A pesar de los espectaculares avances y ventajas que la medicina convencional presenta, es evidente que la medicina tradicional o natural tiene mucho que ofrecer, va tomando especial interés debido a que los antibióticos que en cierto momento mostraban una eficacia prácticamente universal contra infecciones graves, hoy en día está decayendo, por lo que, en la actualidad se está complementando la medicina tradicional con la natural, hecho que está tomando mucha fuerza por los beneficios mostrados contra enfermedades crónicas como el asma, la artritis y el síndrome de colon irritable (Chevallier, 1996).

Por lo antes mencionado es que en los últimos años las plantas medicinales han cobrado increíble importancia y cada vez son más las disciplinas científicas que se están dedicando a la tarea de investigarlas, estudiarlas y aplicarlas para el mundo moderno. Por ende, es necesario, ahondar en esfuerzos para evitar la pérdida definitiva de este conocimiento tradicional y ancestral, no solo para preservar esta herencia cultural, sino también para registrar la información sobre ciertas especies útiles, que podrían ser relevantes para el desarrollo de nuevas fuentes terapéuticas y farmacéuticas para la humanidad, contribuyendo al mismo tiempo a la protección de la biodiversidad vegetal (Bermúdez, Oliveira-Miranda, & Velázquez, 2005).

1.4. Flora Ecuatoriana.

Se considera que en la tierra existen entre 260000 y 320000 especies de plantas (Torres, 2008), y se estima que alrededor del 25% de la diversidad biológica a nivel mundial se encuentra en la región andina; los países que comprenden esta región son considerados como los más diversos y ricos en especies vegetales del planeta. Dentro de la región encontramos tres países con la mayor riqueza herbaria; estos son: Ecuador, Perú y Bolivia, en donde se ha encontrado que existen 34286 especies de plantas, distribuidas en 256 familias y 3309 géneros (Jørgensen, Ulloa, & Maldonado, 2006).

El Ecuador presenta aproximadamente 17000 especies de plantas que son producto de adaptaciones a medios diversos. Ya que, esta gran diversidad de plantas ecuatorianas proviene de especies propias de los Andes Tropicales, de zonas tropicales y subtropicales de América, tropicales de Asia, Malasia, África, así como de zonas templadas de los Hemisferios Boreal y Austral, incluso de las regiones frías del elemento Austral. De acuerdo con estudios realizados se ha determinado que la cuarta parte de las especies ecuatorianas son endémicas, y de ellas tan solo el 7% han sido reportadas como útiles. Para Ecuador se registra que las diez familias más diversas contienen el 45% de los géneros y el 58% de las especies, siendo Orchidaceae la familia más diversa. Entre los géneros con un importante número de especies figuran Piper, Peperomia (Piperaceae), Epidendrum, Pleurothallis (Orchidaceae) entre otros (Jørgensen et al., 2006; Torres, 2008).

Para el Ecuador se reporta una lista con 5172 especies que presentan usos diversos. Esto significa que tres de cada 10 especies que crecen en el Ecuador son útiles para la gente.

Desde el punto de vista taxonómico, el uso de las especies no está distribuido de una forma regular entre las familias, así tenemos que Fabaceae, Asteraceae y Rubiaceae tienen más de 200 especies útiles cada una, por otro lado, familias como Arecaceae, Rosaceae y Meliaceae son extraordinariamente importantes ya que casi el 80% de sus especies son utilizadas para uno o varios propósitos. En relación al tipo de uso, de las 5172 especies útiles, el 60% son medicinales, el 55% son fuente de materiales como los usados para construcción, el 30% son comestibles y el 20% son utilizadas en los llamados usos sociales, que incluyen ritos religiosos y prácticas similares (Torres, 2008).

1.4.1. Flora aromática del Ecuador.

Las plantas aromáticas son aquellas plantas cuyos principios activos están constituidos, total o parcialmente por esencias. Las plantas medicinales y condimentarias entran dentro de esta clasificación ya que el hombre las utiliza en la medicina natural y como especias para mejorar el sabor, olor y color de los alimentos (Restrepo, Díaz, Betancur, Martínez, & Otros, 2013). En este sentido, el Ecuador reporta aproximadamente 3277 especies de plantas entre medicinales y condimentarias. En un número menor especies utilizadas con fines industriales para la obtención de aceites esenciales, grasas, químicos vegetales, etc. (Torres, 2008).

En el Ecuador 159 especies de plantas, pertenecientes a 57 familias, se usan como aditivos en la alimentación. Las familias con mayor número de especies son Asteraceae, Lamiaceae y Piperaceae. La mayoría de estas especies se utilizan como condimentos y saborizantes en la preparación de varias bebidas y comidas. Comúnmente utilizadas para la preparación de bebidas tenemos: las inflorescencias de sankurachi (*Amaranthus caudatus* y *A. crassipes*), el bleado (*A. hybridus*), y las hojas de arrayán (*Eugenia* sp., *Luma chequen* u otras Myrtaceae). Asimismo, para dar sabor, la canela (*Cinnamomum zeylanicum*), ishpinku (*Ocotea quixos*), el clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), las hojas de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) y de cedrón (*Aloysia triphylla*). En preparaciones dulces y bebidas para dar sabor se utiliza el fruto de varias especies nativas de vainilla (*Vanilla claviculata*, *V. mexicana*, *V. odorata*, *V. palmarum*, *V. planifolia* y *V. pompona*), etc.

Con fines medicinales se reportan 3118 especies de plantas aromáticas pertenecientes a 206 familias. El 75% de las especies medicinales son plantas nativas y un 5% son

endémicas, mientras que el 11% son introducidas en el Ecuador. Dentro de esta categoría, el 69% de las especies se usa para combatir dolores de cabeza, estómago y músculos. Las especies más usadas para este fin son las introducidas, entre ellas la hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), la ruda (*Ruta graveolens*) y la manzanilla (*Matricaria recutita*). El 18% de especies se utilizan para tratar problemas fúngicos, siendo las más mencionadas *Iryanthera paraensis*, *Calathea metallica* y *Fittonia albivenis*. Gran parte de las plantas en esta categoría como el paico (*Chenopodium ambrosioides*), el higuérón (*Ficus insipida*) y la papaya (*Carica papaya*) se utilizan para eliminar parásitos intestinales (lombrices y amebas). Esto por citar algunos ejemplos, pero la realidad es que el uso de las plantas medicinales en el Ecuador es muy amplio para tratar diversas enfermedades, dolores, y padecimientos.

En el área industrial encontramos un número menor de plantas aromáticas, siendo así: 603 taxones para la extracción de químicos vegetales utilizables en la elaboración de jabones para aseo personal y lavado de ropa. Las familias con mayor número de registros fueron Fabaceae, Asteraceae y Solanaceae. Las partes de la planta más utilizadas son las hojas y los frutos. Así mismo, se han empleado decenas de plantas para el lavado del pelo y al mismo tiempo para el tratamiento de la caspa, para fortalecimiento del cabello y evitar su caída. Cabe destacar el uso de plantas con fines cosméticos, como perfumes y desodorantes, en este caso, las flores y los frutos son las partes de la planta más utilizadas, la especie tradicionalmente empleada es la palmera chontilla blanca (*Chamaedorea pinnatifrons*). Finalmente, muchas plantas se han empleado para el cuidado e higiene de la dentadura y encías. Los géneros más destacados son: Myrcianthes, Piper y hierba luisa (*Cymbopogon citratus*). El uso de plantas como repelente de insectos molestos o dañinos es una práctica relativamente común, utilizando varias especies del género *Ambrosia* y el palo santo (*Bursera graveolens*). Para la extracción de aceites se encontraron seis especies útiles, varias de ellas introducidas. Cinco de ellas proceden de la región andina y solo una de la región oriental, donde se utiliza como perfume el extracto de guayabillo (*Campomanesia lineatifolia*) (Torres, 2008).

1.5. La Familia Asteraceae.

La familia Asteraceae (Compositae), es una de las más diversas y la más ampliamente distribuida en el planeta. Constituye un grupo monofilético, correspondiente al orden de las

Asterales, suborden Asteridae, y está caracterizada por sus inflorescencias racimosas en capítulos, con flores individuales epíginas, rodeadas de varias hileras de brácteas sobre el receptáculo común en que remata el escapo o rama florífera. Por dicho carácter es considerada un grupo natural y uniforme, altamente evolucionado, y recibe el nombre alternativo *Compositae* Giseke. Posee una serie de tribus cuya delimitación y relación taxonómica aún no es clara. Algunas especies tienen uso en la alimentación humana y animal, muchas son fuentes de aceites fijos, aceites esenciales, forrajes, miel y polen, edulcorantes, especias, colorantes, insecticidas, cauchos y madereras. Otras son importantes como malezas y plantas tóxicas, varias de estas plantas causan alergias y otras resultan ornamentales. Un buen número de ellas son conocidas por su marcado comportamiento arvense, como malezas de cultivos y jardines o como ruderales en los caminos. La familia Asteraceae está conformada por 18 tribus, con cerca de 950 a 1450 géneros y entre 20000 a 30000 especies en todo el mundo (Del Vito & Petenatti, 2009; Redonda-Martinez & Villasenor-Rios, 2011).

Este grupo de plantas está caracterizado por la presencia de ácidos iso- y clorogénico, isoflavonoides, lactosas sesquiterpénicas, alcoholes triterpénicos pentacíclicos, aceites esenciales (con predominio de terpenoides), alcaloides (especialmente pirrolizidínicos) y diversos derivados acetilénicos, mientras que carece de taninos verdaderos y de iridoideas. La acumulación de ciertos metabolitos primarios y secundarios determina la utilidad y su aplicación (Del Vito & Petenatti, 2009).

1.5.1. El género *Tagetes*.

El género *Tagetes* es originario de Sudamérica, Pero actualmente posee una distribución cosmopolita y representa uno de los grupos más ricos en formas de las angiospermas. Cuenta con cerca de 60 especies, son de un ciclo de desarrollo anual o bienal, suelen crecer cubriendo todo el territorio a su alrededor, puede alcanzar hasta los 60 cm de altura, estas plantas no siempre son verdes ya que pierden las hojas por algunos meses durante el año. Presenta una alta importancia económica e incluye especies de plantas comestibles y ornamentales. Los extractos de las especies de este género se caracterizan por su actividad insecticida y nematocida, además de sus aplicaciones farmacéuticas (Stefanazzi, Gutierrez, Stadler, Bonini, & Ferrero, 2006).

Las especies más comunes de este género son: *T. minuta*; *T. patuta* y *T. terniflora*. La composición química entre las especies de tagetes es diversa, algunos de los compuestos encontrados en los aceites pertenecen al grupo de los alcoholes, carbohidratos, éteres, aldehídos, cetonas, ésteres, carotenoides, flavonoides y tirofenos; entre los principales compuestos podemos encontrar: b-Cariofileno, dihidrotagetona, E-tagetona, E-tagetenona, limoneno, metil eugenol, piperitenona, terpinoleno y Z-tagetona. Mucha de esta variabilidad de la composición química puede atribuirse al lugar y sitio de crecimiento de la planta, a la parte de la cual se extrae el aceite, la composición del suelo, etapa fenológica de la planta entre otros; por lo que es común encontrar diferencias en el contenido del aceite entre vegetales de la misma especie (Yumi Mullo, 2011).

1.5.1.1. *Tagetes terniflora*.

Es una planta de tipo anual, semirustica, con ramas delgadas, de color verde claro y suele brotar desde el mes de junio. Es conocida por los nombres vernáculos de “huacatay mula”, “chiche” y “chilche”. Puede llegar a alcanzar entre los 30 y 60 cm de alto, está ampliamente difundida en los valles andinos de entre los 500 y 4500 m.s.n.m. No se tiene mucha bibliografía sobre esta planta, pero se sabe que el aceite esencial posee actividad repelente, toxicidad, efecto fumigante, índices nutricionales y actividad fagodisuasiva en larvas. Una infusión de sus hojas se usa como una gastralgia y un antídoto ante intoxicaciones. Se usan las partes aéreas de la planta para el tratamiento de úlceras gástricas y enteritis. En uso veterinario, las partes aéreas se consideran un antiparasitario potente para uso externo. También partes aéreas se utilizan como agente aromatizante en alimentos; la actividad mostrada por esta especie puede deberse a la presencia de cetonas monoterpenos y tienilo, compuestos acetilénicos y tiofenos (De Feo, Urrunaga Soria, Urrunaga Soria, & Pizza, 2005; Yumi Mullo, 2011).

En el Ecuador se la conoce con el nombre de “chilchi”. Es utilizada tradicionalmente como colorante para las comidas y las partes aéreas de la planta se emplean con fines medicinales, para tratar dolores intestinales, malestares estomacales y migrañas. Por otra parte, el aceite esencial ha demostrado bioactividad frente a insectos de importancia económica y sanitaria (Almirón, Stefanzi, González, & Ferrero, 2013).



Figura 3. Especie, *Tagetes terniflora*.

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

Tabla 1. Taxonomía de *Tagetes terniflora*.

REINO:	Plantae
DIVISIÓN:	Angiospermophyta
CLASE:	Magnoliopsida
ORDEN:	Asterales
FAMILIA:	Asteraceae (Compositae)
TRIBU:	Helenieae
SUBFAMILIA:	Asteroideae
GÉNERO:	Tagetes
ESPECIE:	Terniflora

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

CAPITULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Metodología.

Para llevar a buen término el presente estudio investigativo, la metodología utilizada fue la siguiente:



Figura 4. Esquema del proceso investigativo.

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

2.1.1. Recolección del material vegetal.

La materia vegetal utilizada en el presente trabajo fue identificada a través de la revisión bibliográfica como de muestras botánicas que reposan en los archivos de la Universidad Técnica Particular de Loja.

La planta en estudio fue recogida en el barrio Pichig de la parroquia San Lucas, perteneciente al cantón y provincia de Loja. La colección de la planta se la realizó mediante tres salidas de campo, con un lapso de reposo de 15 días cada visita.

El material fue colectado en estado de foliación dentro de su hábitat natural, se tomó como muestra durante cada salida entre 3.5 y 4.5 Kilogramos aproximadamente. La muestra cosechada fue transportada en sacos hasta el Laboratorio de Ingeniería de Procesos y, en el área de Aceites Esenciales se llevó a cabo su tratamiento pos cosecha y ulterior destilación.

Durante el tratamiento pos-cosecha se examinó y separó manualmente las partes deterioradas, manchadas y con señales de ataque de insectos y hongos, esto con el objetivo de conservar las características físicas, organolépticas y farmacológicas de la materia vegetal, ya que, en caso de no tener precaución de estos aspectos obtendríamos un aceite de baja calidad, con posible pérdida de principios activos. Además, Se cortó el material en partes pequeñas para lograr una mejor área de contacto, de tal manera que el vapor generado durante la destilación atravesase con mayor facilidad la materia vegetal alcanzando un mejor rendimiento.

2.1.2. Determinación de la humedad de la planta.

Para determinar la humedad de la planta, se practicó el ensayo de humedad, que consiste en pesar en una capsula de porcelana (previamente tarada) 1 g de materia vegetal cortada en pedazos muy finos, luego, llevar la capsula con la muestra hasta una lámpara ULTRA X, donde se deja por un lapso de 45 minutos. Una vez consumado el tiempo en la lámpara se colocan las muestras en el desecador por 15 minutos más con el objetivo de eliminar el agua presente en las mismas. Finalmente, se debe registrar los pesos obtenidos en la balanza y, si varían mucho unos respecto a otros se debe repetir todo el procedimiento

entre 3 y 4 veces con la muestra inicialmente pesada hasta lograr que los pesos no varíen significativamente. Estos ensayos se realizaron por triplicado para cada muestra y por cada recolección. Una vez finalizado todo el procedimiento se realizaron los cálculos respectivos de Humedad (Ver Anexo I).

2.1.3. Extracción del aceite esencial.

Con la materia vegetal sometida al tratamiento pos cosecha y lista para ingresar al siguiente proceso, se comenzó con la obtención del aceite esencial por medio de hidrodestilación, que consiste en obtener el aceite esencial de la planta haciendo pasar vapor de agua a través de un destilador.

Las condiciones de operación del destilador fueron previamente ensayadas, con lo cual, se determinó que las mejores condiciones de trabajo para la presente investigación serían: dejar destilar el material vegetal fresco por un lapso de 4 horas.

Para empezar con la destilación de la planta, se procedió a llenar el destilador con 18 litros de agua aproximadamente. Inmediatamente se colocó el material vegetal sobre una parrilla dentro del destilador y se procedió a cerrar la tapa con su respectivo sello de agua. Seguidamente, se colocaron las mangueras en el condensador para refrigerar el vapor generado y así poder obtener el aceite esperado. Finalmente, se enciende el destilador y se deja trabajar por el tiempo especificado anteriormente, controlando en cada momento la temperatura, para evitar que la muestra se pueda llegar a quemar.

Una vez que se ha concluido con el tiempo de destilado y no exista más extracción de aceite esencial, se procede a retirar el aceite del florentín por medio de una probeta. El aceite esencial siempre viene acompañado de una cantidad importante de agua aromática, como se conoce al agua obtenida luego del proceso de destilación. Pero, por medio de diferencia de densidades es posible separar el aceite del agua aromática. Una vez separado el aceite medimos el volumen obtenido del mismo y, se procede a envasar en frascos ámbar. Para mantener el aceite en buenas condiciones y evitar que se degrade por efecto de la luz se lo almacenó a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$,

2.1.3.1. *Determinación del rendimiento.*

Para el cálculo del rendimiento del aceite esencial de *T. terniflora* se hace una relación de volumen de aceite obtenido con la materia vegetal colectada para la destilación. El cálculo se realizó para cada destilación, de modo que se reportó el promedio del porcentaje de rendimiento por cada recolección (Ver Anexo II).

2.1.4. *Determinación de las propiedades físicas.*

Las propiedades físicas que se determinaron fueron: la densidad relativa, el índice de refracción y la actividad óptica.

2.1.4.1. *Densidad relativa.*

Este parámetro se lo identificó mediante la aplicación de la norma AFNOR NF T75-111 (ISO 279:1998). Es necesario tener en cuenta que la determinación de la densidad se hace a una temperatura constante, preferiblemente a temperatura ambiente entre 20 y 25 °C (Ver Anexo III).

2.1.4.2. *Índice de refracción.*

Se calculó a partir de la norma AFNOR NF 75-112 (ISO 280:1998), mediante la utilización de un refractómetro, que es un dispositivo que nos permite medir la velocidad de una propagación de luz en el aceite esencial a una temperatura determinada de 20 °C (Ver Anexo IV).

2.1.4.3. *Actividad óptica.*

Para medir la actividad óptica se usó un polarímetro digital y una celda de 1 dm de longitud, en el cual se midió la capacidad para desviar la luz polarizada del aceite esencial de la muestra (Ver Anexo V).

2.1.5. Determinación de la composición química del aceite esencial.

Para llevar a cabo la caracterización química del aceite esencial de *T. terniflora*. Se utilizó la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas GC–MS. El equipo utilizado es un Cromatógrafo de Gases Agilent serie 6890N, acoplada a un Espectrómetro de Masas Agilent serie 6890N, constituido con un sistema de datos MSD-Chemstation D.01.00SP1, el cual cuenta con un inyector automático split/splitless serie 7683. Además, se contó con un detector de ionización de llama (FID) provisto de un generador de hidrógeno “Gas Generator 9150 Packard”, para la mejor versatilidad del equipo.



Figura 5. Cromatógrafo de gases.

Fuente: Laboratorio de química.

Elaboración: El autor.

2.1.5.1. Cromatografía de gases.

2.1.5.1.1. Preparación de la muestra.

Para la lectura en el cromatógrafo de gases se procedió a preparar un vial con una disolución de 990 μL de diclorometano y 10 μL del aceite esencial de *T. terniflora*. El material utilizado para preparar las muestras estuvo totalmente limpio y rotulado para evitar que las muestras se contaminen o interfieran en el análisis. Para este ensayo se prepararon tres muestras para cada corrida, una por cada destilación de aceite esencial de *T. terniflora*.

Además, se realizó la inyección de hidrocarburos (C10 decano a C25 pentacosano) comercialmente conocidos como TPH-6RPM. Los Hidrocarburos fueron inyectados bajo los mismos parámetros que los aceites, tanto para la columna DB-5MS como para la HP-INOWAX, esto con la finalidad de obtener los índices de Kovats, los mismos que son indispensables para la determinación de la composición química del aceite esencial de *T. terniflora*.

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



Figura 6. Condiciones operacionales para la corrida cromatográfica en la columna no polar DB-5MS

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

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



Figura 7. Condiciones operacionales para la corrida cromatográfica en la columna polar HP-INNOWAX.

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

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



Figura 8. Condiciones operacionales para la corrida cromatográfica en la columna no polar DB-5MS acoplada al detector de ionización en llama CG-FID.

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

2.1.5.1.2. *Identificación de los compuestos químicos.*

La identificación comprende en determinar simultáneamente cuántos, cuáles y en qué proporción están los componentes de un aceite esencial. La determinación cualitativa de la composición química del aceite esencial se la realizó a través de la comparación computarizada de los espectros de masas de cada uno de los compuestos con los de la librería de datos y mediante los índices de retención de Kováts (IK) (Ordaz, D Armas, Yáñez, & Moreno, 2011).

La determinación cuantitativa se realizó con vistas a determinar los contenidos de cada componente identificado. Para ello, se empleó el método de normalización interna que es ampliamente utilizado para este tipo de análisis ($n = 2$) (Ortiz Bode, 2013). Para una identificación mucho más confiable se integraron los compuestos a través del sistema de integración (Chemstation Integrator-autoint1.e), propio del software del CG-MS, de esta manera los datos son mucho más manejables con los picos integrados.

Ya obtenidos los cromatogramas, se determinaron los índices de kovats de los picos detectados por medio del tiempo de retención de una serie de n-alcanos, como estándares de referencia, tanto para la columna DB-5MS como para la HP-INNOWAX.

El índice de Kovats (IK) es un término propuesto por Kovats en 1958, el cual relaciona los componentes del aceite esencial con una serie de n-parafina multiplicada por 100 (Fenández, Buitrago, Velasco, Rojas, & Morales, 2008). Por lo tanto, los índices de Kovats experimentales se calcularon por comparación de los tiempos de retención de los hidrocarburos (C10 a C25) con relación al tiempo de retención de los compuestos aplicando la siguiente fórmula:

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

Dónde:

IK: Índice de retención de Kovats;

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

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

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

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

La identificación de los compuestos se llevó a cabo en base a los IK determinados en la columna polar y en la no polar, luego se compararon con los reportados por Adams (Adams, 2007), bases de datos electrónicas (Pherobase o Nist), entre otras.

Cada compuesto presenta un espectro de masas característico el cual proporciona información estructural sobre la molécula analizada. Los espectros de masas de cada componente son analizados por la base de datos del equipo para compararse con la colección de espectros de la librería Wiley 7n.1.; que ofrece el sistema. Para el análisis se seleccionó los que tuvieron un grado de correspondencia mayor al 90%. Cada componente presenta un número de CAS, de forma que se facilita y es posible la búsqueda e identificación en bases de datos disponibles para obtener los IK de los compuestos (Ver Anexo VI).

2.1.6. Determinación de la actividad biológica.

Mediante esta prueba se determinó la susceptibilidad de los microorganismos (Bacterias y Hongos) frente a la actividad biológica del aceite esencial de *Tagetes terniflora*, determinando la Concentración Mínima Inhibitoria (C.M.I) del aceite, esta última dependió de la susceptibilidad de los microorganismos de trabajo a las concentraciones evaluadas. Para esta prueba se emplearon 7 cepas bacterianas y 2 cepas fúngicas. Además, se empleó una dilución de 20 mg/mL de aceite esencial más 980 uL de DMSO. Dilución utilizada tanto para bacterias como para hongos. La prueba se realizó mediante el método de microdilución en caldo del aceite esencial de *T. terniflora*.

Las cepas bacterianas fueron: 2 Gram Positivas: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, y 5 Gram Negativas: *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 9997, *Proteus vulgaris* ATCC 8427, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella Typhimurium* LT2. Y en la prueba antifúngica se emplearon 2 cepas de hongos esporulados: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 28185 y *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

2.1.6.1. Actividad Antibacteriana.

2.1.6.1.1. Preparación del cultivo microbiano “cultivo overnight”.

Para la siembra, se transfirió 30 μL de cada cepa bacteriana, almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una reserva criogénica, a caldos de cultivo específicos para el crecimiento de la bacteria en estudio. Una vez realizada la siembra de cada cepa, se incuban los medios por el lapso de 14 a 16 horas y a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; por esta razón se denominan overnight.

2.1.6.1.2. Preparación de la suspensión del inóculo bacteriano.

Del cultivo microbiano (overnight) incubado durante la noche, se transfirió 150-300 μL a un tubo que contenía 7 mL de suero fisiológico estéril ajustando el inóculo a una concentración equivalente a 0.5 en la escala de MacFarland; para llevar a cabo adecuadamente este paso, se comparó visualmente el tubo con el inóculo y el estándar de McFarland al 0,5 frente a una cartulina con fondo blanco y rayas negras de contraste.

De la suspensión en solución salina se tomó 140 μL y se inoculó en 6.86 mL de Caldo Mueller Hinton, ajustando a una población bacteriana de 2×10^6 UFC/mL. De la suspensión resultante se transfirieron 100 μL a la placa de cultivo para completar un volumen final de 200 μL , de forma que en cada pocillo la concentración final fue de 5×10^5 UFC/mL.

2.1.6.1.3. Procedimiento.

La prueba se realizó en microplacas que contienen 96 pocillos empleando el procedimiento de dilución doble seriada: se transfirió 180 μL de caldo Mueller Hinton a cada pocillo de la primera fila, seguido se colocó 100 μL a los pocillos restantes, posteriormente se transfirió 20 μL de la solución de aceite diluido a cada pocillo de la primera fila excepto los últimos pocillos, los cuales se utilizaron como control positivo (180 μL caldo + 20 μL de Gentamicina de 1 mg/mL para todas las bacterias utilizadas a excepción de *Enterococcus faecalis* para la cual se empleó Ampicilina de 8 mg/mL) y negativo (180 μL caldo + 20 μL DMSO), de manera que para cada aceite evaluado se sembró por duplicado con su respectivo control de esterilidad (180 μL caldo + 20 μL aceite diluido).

Se mezcló el medio con el aceite y se procedió a realizar diluciones seriadas; se pipeteó de 15 a 20 veces la solución del primer pocillo del cual luego se tomó 100 μL y se diluyó con 100 μL del pocillo siguiente, se continuó este procedimiento hasta obtener 8 diluciones consecutivas (Figura 10), así la concentración final de la solución de aceite fue de 1000 a 7.81 μL . El mismo procedimiento fue aplicado para los controles: 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 controles de esterilidad; completando así un volumen final de 200 μL , ajustando la población bacteriana a 5×10^5 UFC/mL. Las placas se sellaron con parafilm y fueron incubadas a 37 °C de 18-24 h.

2.1.6.2. Actividad Antifúngica.

2.1.6.2.1. Preparación de la suspensión de los inóculos fúngicos.

De los hongos esporulados utilizados en esta investigación: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 28185 y *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, almacenados en una reserva criogénica a -80 °C, se tomó 49 μL y 68 μL respectivamente, cada volumen se transfirió a tubos que contenían 7 mL de caldo de Sabouraud.

2.1.6.2.2. Procedimiento.

Se empleó el mismo procedimiento de dilución seriada utilizado para las bacterias, diferenciándose en la concentración final del inóculo, en hongos esporulados es 5×10^4 esporas/mL; la concentración final de aceite va de 1000 a 0.48 $\mu\text{g/mL}$, las diluciones se realizan hasta obtener 12 diluciones consecutivas, y al final se colocaron los 100 μL de la suspensión del inóculo fúngico.

Cada aceite evaluado se siembra por duplicado con su respectivo control de esterilidad (180 μL caldo + 20 μL aceite diluido), existe un control positivo (180 μL caldo + 20 μL de Itraconazol de 1 mg/mL), un control negativo (180 μL caldo + 20 μL DMSO). Se incuban las placas a 28 °C y se monitorea el crecimiento hasta las 96 horas.

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Recolección del material vegetal.

La materia vegetal se colectó en el barrio Pichig en las coordenadas 3°42'34.0"S 79°15'59.1"W mediante tres salidas de campo; en la tabla número 2 se muestran las cantidades recolectadas durante cada salida de campo.

Tabla 2. Kg de muestra recolectada por salida de campo.

	Muestra (Kilogramos)
Recolección 1	4.529 kg
Recolección 2	3.600 kg
Recolección 3	3.900 kg

Fuente: Investigación experimental.

Elaboración: El autor.

Durante cada recolección se trató de tomar entre 3.5 y 4.5 kg de la muestra en estudio.

3.2. Determinación de la humedad.

La humedad se calculó con el procedimiento descrito en la metodología. En la tabla 3 se muestra los valores obtenidos de humedad.

Tabla 3. Porcentaje de humedad.

RECOLECCIONES	HUMEDAD RELATIVA (%)	\bar{X}	σ
TT01	72.9		
TT02	73.3	73.15	0.18
TT03	73.2		

TT01, primera recolección.

TT02, segunda recolección.

TT03, tercera recolección.

X: Media aritmética correspondiente a las diferentes recolecciones.

σ : Desviación estándar.

Fuente: Investigación experimental.

Elaboración: El autor.

Se puede observar que la humedad relativa entre las muestras no presenta cambios significativos, obteniéndose un valor medio de 73.15% de humedad. La humedad es muy importante en aceites esenciales pues el exceso de agua es el responsable de obtener un aceite de baja calidad. Además, la humedad de una planta es la responsable de las diferencias cuantitativas dentro de los componentes principales del aceite esencial, se deben en parte a la distribución de un quimiotipo específico dentro de una misma región geográfica, en donde pueden existir diferencias climáticas como la temperatura, el grado de luminosidad, la humedad relativa y, otros factores como el tipo de suelo y sus características como estructura y composición (Dellacassa, 2010).

3.3. Determinación del rendimiento.

Los datos obtenidos para rendimiento de *Tagetes terniflora* se muestran a continuación en la tabla número 4.

Tabla 4. Porcentaje de rendimiento.

RECOLECCIONES	MUESTRA (g)	ACEITE ESENCIAL (ml)	RENDIMIENTO (%)	\bar{X}	σ
TT01	4529	4.1	0.091	0.072	0.02
TT02	3600	3	0.083		
TT03	3900	1.7	0.044		

TT01, primera recolección.
 TT02, segunda recolección.
 TT03, tercera recolección.
 \bar{X} : Media aritmética correspondiente a las diferentes recolecciones.
 σ : Desviación estándar.

Fuente: Investigación experimental.

Elaboración: El autor.

El rendimiento de los aceites esenciales se calcula haciendo una relación volumen/peso; de la especie en estudio, se obtuvo una media de 0.072%. Debemos indicar que el rendimiento de *T. terniflora* vario de acuerdo con cada una de las recolecciones; observándose que el rendimiento de la primera destilación (0.091%) es mayor respecto a la tercera donde se obtuvo un rendimiento de 0.044%. Esta diferencia puede deberse a

varios factores: el contenido de humedad; el hábitat de la planta, la época de recolección, entre otros (S. P. G. Rivera, Cardozo, & García, 2004).

Según la categorización propuesta por el organismo de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED Argentina), los valores de rendimiento menores a 5 mL/Kg los considera bajos, valores entre 5 mL/Kg y 10 mL/Kg intermedios, y valores superiores a 10 mL/Kg altos (Molares, González, Ladio, & Castro, 2009). El aceite esencial de la muestra *T. terniflora* presenta un rendimiento bajo, por cuanto en la relación volumen-peso nos encontramos con un valor de 0.72 mL/kg.

El contenido y cantidad de aceite de esencial de Tagetes depende del lugar y sitio de crecimiento de la planta, de la etapa de floración, de la parte de la cual se extrae el aceite, la composición del suelo y la fertilización mineral, entre otros, por lo que es común encontrar diferencias en el contenido del aceite entre los vegetales de la misma especie (Yumi Mullo, 2011).

3.4. Determinación de las propiedades físicas del aceite esencial.

3.4.1. Densidad del aceite esencial.

En la tabla número 5 se encuentra detallado el valor promedio de densidad obtenido para las diferentes recolecciones realizadas de la muestra *T. terniflora*.

Tabla 5. Densidad relativa del aceite esencial *T. terniflora*.

ECOLECCIONES	DENSIDAD (g/cm ³)	\bar{X}	σ
TT01	0.9420		
TT02	0.9339	0.9398	0.0051
TT03	0.9435		

TT01, primera recolección.
 TT02, segunda recolección.
 TT03, tercera recolección.
 \bar{X} : Media aritmética correspondiente a las diferentes recolecciones.
 σ : Desviación estándar.

Fuente: Investigación experimental.

Elaboración: El autor.

Como podemos observar, la densidad obtenida para la muestra en estudio fue de 0.9398 g/cm³. Densidad que es menor a la del agua, por lo tanto, esta diferencia de densidades es lo que permitió la separación del aceite esencial del agua luego de la hidrodestilación. Además, debemos mencionar que este valor de densidad se encuentra dentro los parámetros establecidos en la literatura para aceites esenciales, que corresponden a valores entre 0.84 y 1.18 g/cm³, dependiendo de la especie y lugar de origen. Este resultado nos indica la calidad y pureza que muestra el aceite esencial.

3.4.2. Índice de refracción del aceite esencial.

En la tabla número 6 se muestran los resultados obtenidos del índice de refracción para el aceite esencial de *T. terniflora* de cada una de las recolecciones ensayadas.

Tabla 6. Índice de refracción del aceite esencial *T. terniflora*.

RECOLECCIONES	ÍNDICE DE REFRACCIÓN	\bar{X}	σ
TT01	1.5102		
TT02	1.5142	1.5142	0.0041
TT03	1.5183		

TT01, primera recolección.
 TT02, segunda recolección.
 TT03, tercera recolección.
 \bar{X} : Media aritmética correspondiente a las diferentes recolecciones.
 σ : Desviación estándar.

Fuente: Investigación experimental

Elaboración: El autor

En su gran mayoría las esencias vegetales muestran índices de refracción entre 1.40 y 1.61 a 20 °C y como se observa, el valor encontrado para de índice de refracción del aceite de la especie *T. terniflora* es de 1.5142, por lo tanto, se encuentra entre los reportados en la literatura para aceites esenciales (Murillo, Suarez, & Salamanca, 2014).

Esta propiedad nos indica la pureza y calidad del aceite en estudio, además, este parámetro es característico de cada aceite y solo cambia si se diluye o se mezcla con otras sustancias.

3.4.3. Actividad óptica específica del aceite esencial.

En la tabla 7 se detallan los valores de actividad óptica encontrados en el aceite esencial de la muestra *T. terniflora*, y que, a su vez corresponden a cada una de las recolecciones realizadas.

Tabla 7. Actividad óptica del aceite esencial *T. terniflora*.

RECOLECCIONES	ACTIVIDAD ÓPTICA	\bar{X}	σ
TT01	1.4733°		
TT02	-1.2244°	-0.3415°	1.5719
TT03	-1.2733°		

TT01, primera recolección.
TT02, segunda recolección.
TT03, tercera recolección.
 \bar{X} : Media aritmética correspondiente a las diferentes recolecciones.
 σ : Desviación estándar.

Fuente: Investigación experimental.

Elaboración: El autor.

La actividad óptica mostrada por el aceite esencial de *T. terniflora* es baja, corresponde al valor de -0.3415° y es de tipo levógiro, es decir que rota en sentido contrario a las manecillas del reloj. A través de esta técnica podemos comprobar la pureza y determinar la concentración de sustancias ópticamente activa.

3.5. Compuestos químicos del aceite esencial de *T. terniflora*.

3.5.1. Análisis cualitativo y cuantitativo.

En la figura se pueden apreciar los cromatogramas obtenidos a través de la técnica de cromatografía de gases del aceite esencial de *T. terniflora*, tanto en DB-5MS (Columna no polar) como en HP-INNOWAX (Columna polar).

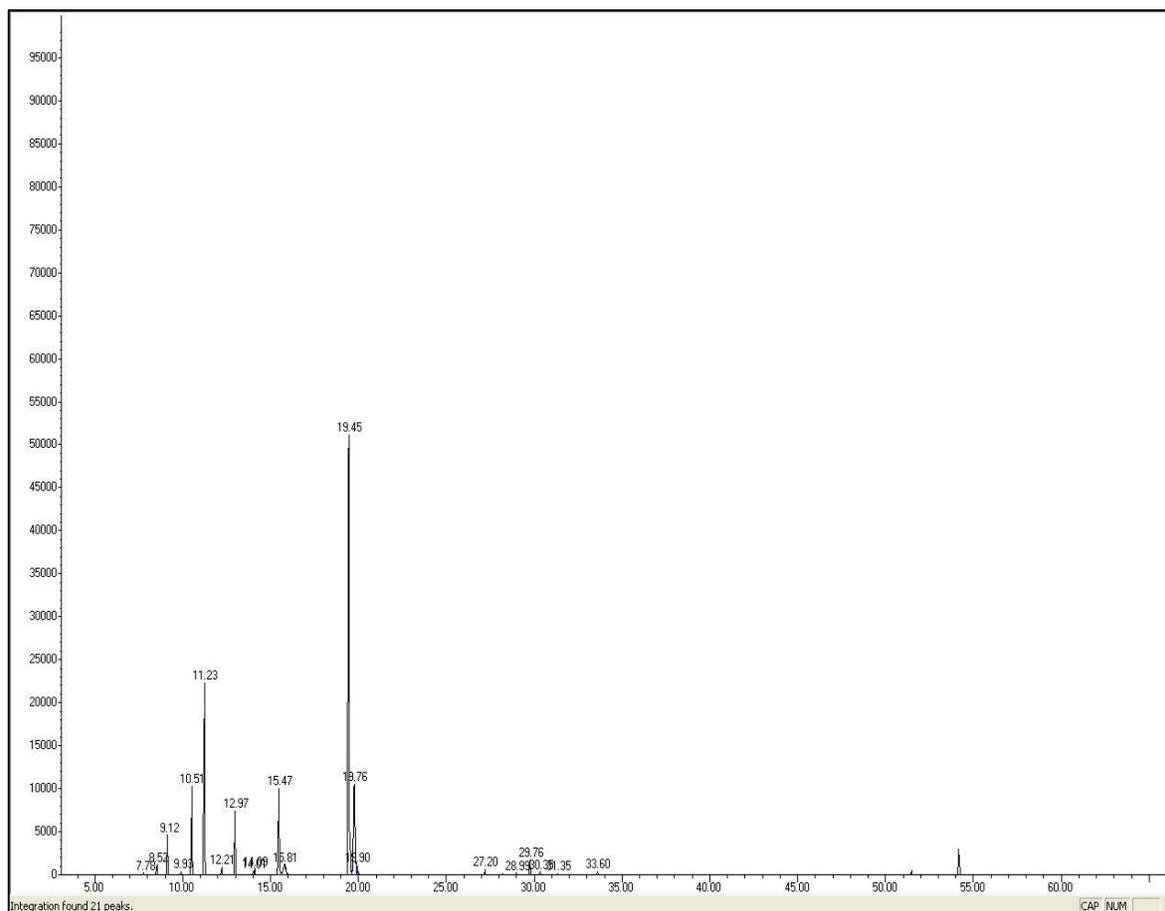


Figura 9. Cromatograma del aceite esencial de *T. terniflora* en la columna no polar DB-5MS.

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

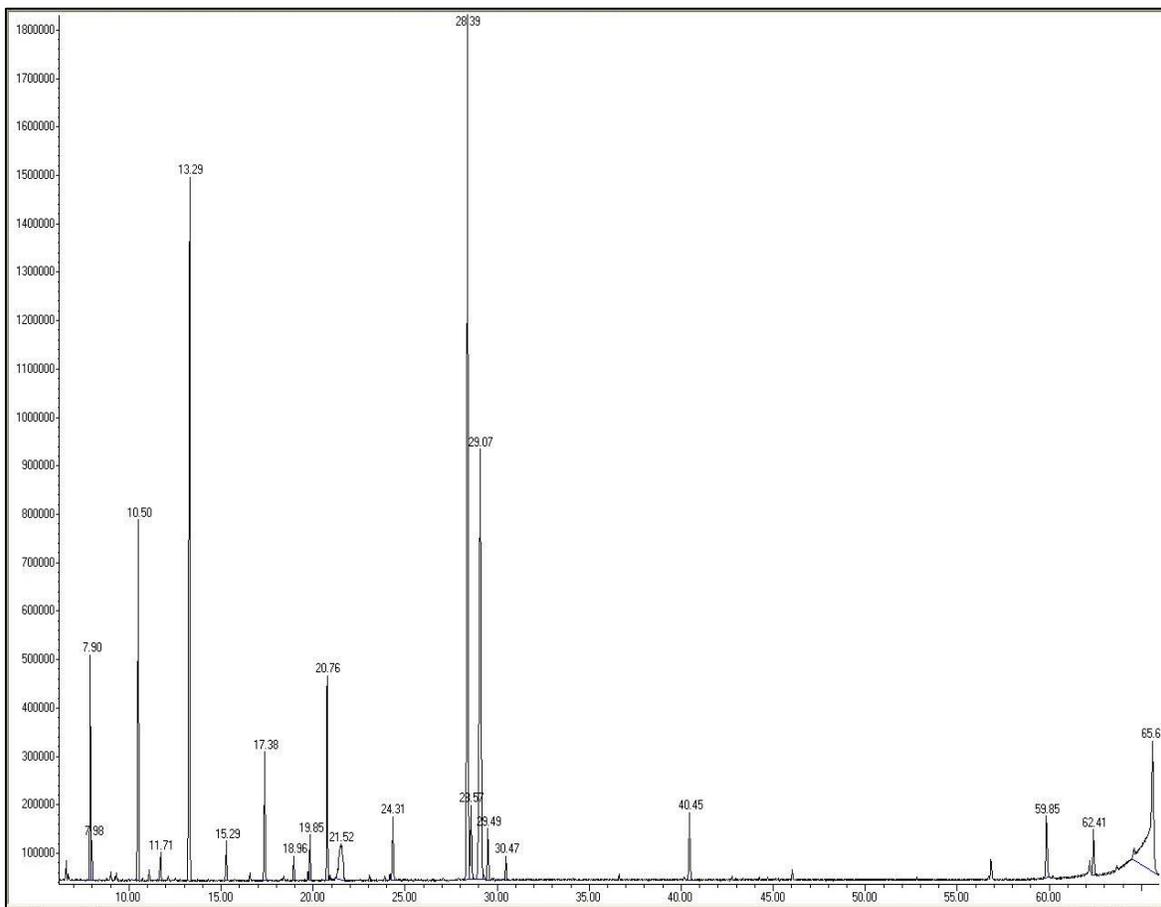


Figura 10. Cromatograma del aceite esencial de *T. terniflora* en la columna polar HP-INNOWAX.
Fuente: El autor.
Elaboración: El autor.

En la tabla 8 y 9 se detallan los compuestos mayoritarios encontrados en el AE de *T. terniflora* para las columnas DB5-MS y HP-INNOWAX respectivamente. Esto correspondería a la caracterización de los compuestos químicos obtenidos del cromatógrafo de gases. Así mismo, se explican los compuestos con mayores áreas, se indican los índices de Kovats, el porcentaje promedio y la desviación estándar para cada compuesto.

Tabla 8. Composición química del aceite esencial de *T. terniflora* en la columna no polar DB-5MS.

N°	COMPUESTOS	DB-5MS						
		IK ^{Cal}	IK ^{REF}	% DE CANTIDAD RELATIVA ^a			\bar{X}	σ
				TT01	TT02	TT03		
1	α -phellandrene	1002	1003 ^c	0.97	2.57	1.35	1.63	0.83
2	O-Cymene	1021	1024 ^d	2.02	0.21	0.35	0.86	1.01
3	β -Ocimene	1034	1037 ^e	5.20	5.58	4.61	5.13	0.49
4	Dihydrotagetone	1050	1055 ^f	15.44	13.31	6.81	11.85	4.50
5	6,7 Epoxymyrcene	1090	1092 ^b	2.85	3.94	1.33	2.71	1.31
6	E-Tagetone	1145	1146 ^g	8.61	6.92	4.52	6.68	2.05
7	Z-tagetone	1152	1146 ^b	2.75	1.97	6.62	3.78	2.49
8	Z-Ocimenone	1232	1229 ^b	47.31	46.18	55.91	49.80	5.32
9	E-Ocimenone	1239	1239 ^h	6.55	13.85	12.95	11.11	3.98
*TOTAL IDENTIFICADO							93.56	

a= Promedio calculado en base al % de área de los picos reportados en la columna DB-5MS.
 *= Sumatoria del porcentaje relativo de los compuestos identificados en la columna DB-5MS.
 TT01=Aceite de la primera recolección.
 TT02=Aceite de la segunda recolección.
 TT03=Aceite de la tercera recolección.
 \bar{X} = Promedio.
 σ = Desviación estándar.
 IK^{Cal}= Índice de kovats calculado.
 IK^{Ref}= Índice de kovats reportado en la literatura, anexo VI: ^bref.1; ^cref.2; ^dref.3; ^eref.4; ^fref.5 ^gref.6; ^href.7.

Fuente: Investigación experimental.

Elaboración: El autor.

Tabla 9. Composición química del aceite esencial de *T. terniflora* en la columna polar HP-INNOWAX.

N°	COMPUESTOS	HP-INNOWAX						
		IK ^{Cal}	IK ^{REF}	% DE CANTIDAD RELATIVA ^a			\bar{X}	σ
				TT01	TT02	TT03		
1	Sabinene (β -Thujene)	1117	1115 ⁱ	0.25	0.34	0.52	0.37	0.14
2	α -phellandrene	1159	1165 ^w	-----	4.28	1.25	1.85	2.20
3	β -Myrcene	1162	1165 ^j	0.31	0.74	1.07	0.71	0.38
4	Limonene	1195	1202 ^u	0.52	0.16	0.35	0.34	0.18
5	Eucalyptol	1203	1210 ⁱ	0.70	-----	-----	-----	-----
6	β -Ocimene	1252	1251 ^k	-----	7.45	7.81	5.09	4.41
7	O-Cymene	1268	1268 ^l	5.09	0.59	2.00	2.56	2.30
8	Dihidrotagetone	1310	1319 ^m	54.99	17.14	13.32	28.48	23.04
9	Octanoic acid, methyl ester	1391	1386 ⁿ	0.38	-----	-----	-----	-----
10	6,7-Epoxyterpinene	1411	1415 ^o	-----	2.97	1.83	1.60	1.50
11	E-Tagetone	1495	1501 ^p	5.40	4.86	4.48	4.91	0.46
12	Z-Tagetone	1514	1517 ^q	-----	3.69	10.28	4.66	5.20
13	Caryophyllene	1585	1585 ^r	-----	1.75	3.16	1.64	1.58
14	Z-Ocimenone	1692	1690 ^s	14.73	28.45	32.22	25.13	9.21
15	E-Ocimenone	1711	1710 ^s	-----	20.39	12.19	10.86	10.26
16	Germacrene D	1722	1726 ^v	-----	1.34	0.95	0.76	0.69
17	δ -Cadinene	1750	1751 ^r	-----	0.63	1.56	0.73	0.79
18	Carvone	1759	1722 ^t	0.36	-----	-----	-----	-----
*TOTAL IDENTIFICADO							89.68	

a= Promedio calculado en base al % de área de los picos reportados en la columna HP-INNOWAX.
 * = Sumatoria del porcentaje relativo de los compuestos identificados en la columna HP-INNOWAX.
 TT01=Aceite de la primera recolección.
 TT02=Aceite de la segunda recolección.
 TT03=Aceite de la tercera recolección.
 \bar{X} = Promedio.
 σ = Desviación estándar.
 IK^{Cal} = Índice de Kovats calculado.
 IK^{Ref} = Índice de Kovats reportado en la literatura, anexo VI: ⁱref.8; ^jref.9; ^kref.10; ^lref.11; ^mref.12; ⁿref.13; ^oref.14; ^pref.15; ^qref.16; ^rref.17; ^sref.18; ^tref.19; ^uref.20; ^vref.21; ^wref.22.

Fuente: Investigación experimental.

Elaboración: El autor.

En la figura 12 se aprecian los porcentajes de cada uno de los compuestos mayoritarios identificados en el aceite esencial de *T. terniflora* de la columna DB-5MS, así tenemos: Z-Ocimenone (49.80%), Dihydrotagetone (11.85%), E-Ocimenone (11.12%), E-Tagetone (6.68%) y β -Ocimene (5.13%).

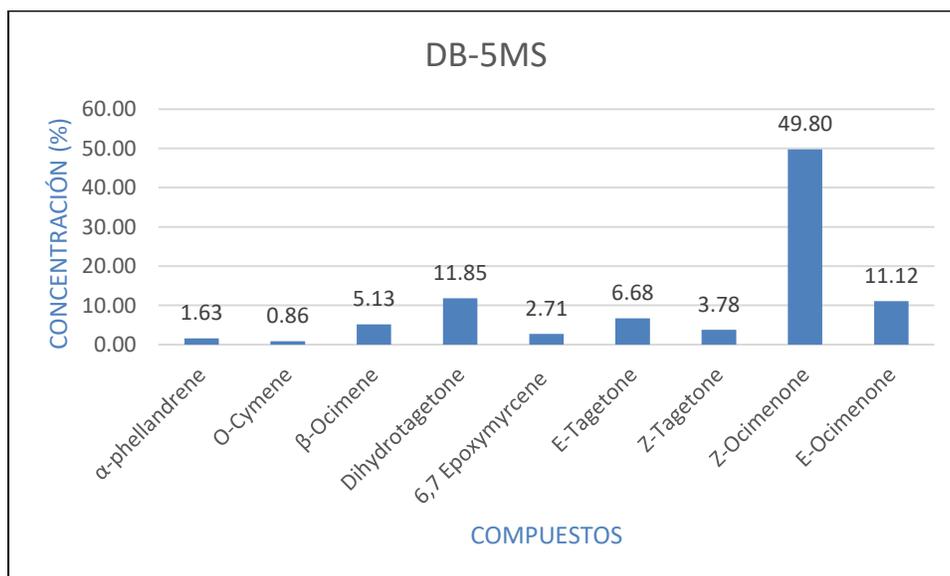


Figura 11. Compuestos mayoritarios en la columna no polar DB-5MS.

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

En la figura 13 se reportan los porcentajes de los compuestos mayoritarios obtenidos de la identificación de la corrida cromatográfica HP-INNOWAX, correspondiente a la columna polar. Los compuestos mayoritarios fueron: Dihydrotagetone (28.48%), Z-Ocimenone (25.13%), E-Ocimenone (10.86%) y β -Ocimene (5.09%).

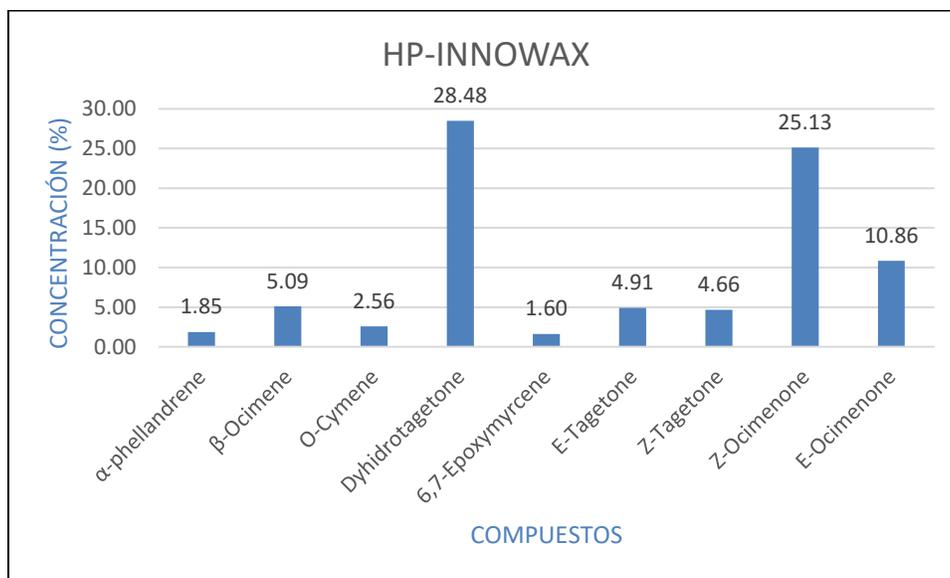


Figura 12. Compuestos mayoritarios en la columna polar HP-INNOWAX.

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

En la tabla 10, se presenta la relación de porcentajes obtenida por medio de los picos encontrados a través del detector de ionización de llama (FID) y de los picos encontrados e identificados a través de la espectrofotometría de masas (MS).

Así mismo, se puede observar los porcentajes de cantidad relativa para cada recolección, el promedio y la desviación estándar. Mediante el análisis se confirmó la presencia de los compuestos identificados en el aceite esencial de *T. terniflora*.

Tabla 10. Composición de la cantidad relativa (%) de los compuestos químicos del aceite esencial de *T. terniflora* en la columna DB-5MS y HP-INNOWAX.

N°	COMPUESTOS	DB-5MS									
		% DE CANTIDAD RELATIVA						\bar{X}		σ	
		TT01		TT02		TT03					
		MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID
1	α -phellandrene	0.97	0.83	2.57	2.30	1.35	0.67	1.63	1.27	0.83	0.90
2	O-Cymene	2.02	1.52	0.21	0.35	0.35	0.82	0.86	0.90	1.01	0.59
3	β -Ocimene	5.20	1.19	5.58	4.61	4.61	4.60	5.13	3.47	0.49	1.97
4	Dihydrotagetone	15.44	24.72	13.31	6.81	6.81	7.78	11.85	13.10	4.50	10.07
5	6,7 Epoxymyrcene	2.85	6.23	3.94	3.20	1.33	3.61	2.71	4.35	1.31	1.65
6	E-Tagetone	8.61	9.41	6.92	5.76	4.52	5.06	6.68	6.74	2.05	2.34
7	Z-tagetone	2.75	3.40	1.97	2.92	6.62	7.29	3.78	4.53	2.49	2.40
8	Z-Ocimenone	47.31	37.09	46.18	42.75	55.91	45.91	49.80	41.92	5.32	4.47
9	E-Ocimenone	6.55	2.50	13.85	14.16	12.95	9.84	11.11	8.84	3.98	5.89
TOTAL IDENTIFICADO								93.56	85.11		
TT01=Aceite de la primera recolección. TT02=Aceite de la segunda recolección. TT03=Aceite de la tercera recolección. \bar{X} =Promedio. σ =Desviación estándar. MS=Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas. FID=Cromatografía de Gases acoplada al Detector de Ionización de llama.											

Fuente: Investigación experimental.

Elaboración: El autor.

La caracterización química del aceite esencial de *T. terniflora* permitió encontrar 21 compuestos químicos en la columna DB-5MS (no polar), de los cuales se identificaron 9, que corresponden a un porcentaje del 93.56%; y en la columna HP-INNOWAX (polar), se identificaron 18 compuestos con un porcentaje de identificación del 89.68%.

Uno de los compuestos que presentó un mayor porcentaje en la composición química del aceite esencial de *T. terniflora* fue el Z-Ocimenone con un 49.80%.

La caracterización de aceite esenciales de las mismas especies, en los cuales las proporciones y compuestos son diferentes entre sí, se ha documentado, y se atribuye a los factores externos y genética de las plantas, además del método de obtención del aceite que también influye en el producto final.

En un estudio realizado por la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, se indica que la composición química del aceite esencial de *T. terniflora* que se ha reportado para muestras tomadas de la provincia de Riobamba; en su mayoría son monoterpenos acíclicos triplemente insaturados como Cis-Osimene, Cis y Trans-Ocimenona y Dihidrotagetona (Yumi Mullo, 2011).

La E-Tagetona es un componente que está presente en todas las especies de Tagetes, su porcentaje es bastante elevado, aunque en *T. terniflora* su presencia está en un porcentaje menor. El metabolito tagetona pertenece a la serie de los monoterpenos no cíclicos y cuando está junto a otros compuestos como la Dihidrotagetona y la Ocimenona, compuestos también registrados para Tagetes son los componentes que le confieren el olor primario a la mayoría de las especies aromáticas de este género cuando se frota o rompen sus hojas, tallos o cabezuelas (Díaz-Cedillo, Serrato-Cruz, Arce-Montoya, & León-de la Luz, 2012).

Los Ocimenos a menudo se encuentran naturalmente como mezclas de las diversas formas que presentan, como cis o trans ocimeno, o como β -ocimeno o α -ocimeno. La mezcla, así como los compuestos puros son de un olor agradable. Por esta razón, por su fragancia dulce y herbal son utilizados en perfumería, y se cree que actúan como defensa para las plantas gracias en parte a su actividad antifúngica (Fahlbusch et al., 2000).

3.6. Análisis de actividad biológica de *T. terniflora*.

3.6.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI).

En la tabla número 11 se muestran los resultados obtenidos para el CMI de *T. terniflora*. Los resultados han sido evaluados para cada uno de los aceites obtenidos en el proceso de destilación.

Tabla 11. Resultados para el CMI de *T. terniflora*.

MICROORGANISMO	MUESTRAS ACEITES		
	TT01	TT02	TT03
	CMI 2000 µg/ml		
Bacterias Gram-negativas			
<i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC 27853)	> 2000	> 2000	> 2000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 9997)	> 2000	> 2000	> 2000
<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 8427)	> 2000	> 2000	> 2000
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	> 2000	> 2000	> 2000
<i>Salmonella typhimurium</i> (LT2)	> 2000	> 2000	> 2000
Bacterias Gram-positivas			
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	> 2000	> 2000	> 2000
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC25923)	> 2000	> 2000	> 2000
Actividad Antifúngica			
<i>Trichophyton rubrum</i> (ATCC 28188)	2000	2000	2000
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (ATCC 28185)	2000	2000	2000

TT01, primera recolección.
 TT02, segunda recolección.
 TT03, tercera recolección.

Fuente: Investigación experimental.

Elaboración: El autor.

Para evaluar la actividad biológica se emplearon los métodos descritos en la metodología, los cuales nos permitieron determinar el grado de susceptibilidad del microorganismo frente al aceite esencial en estudio. En la tabla se pueden apreciar los resultados obtenidos de CIM de cada una de las destilaciones frente a cepas bacterianas gram-negativas (5) y gram-positivas (2). Así mismo, de los datos presentados, se puede indicar, que el aceite esencial de *T. terniflora* no muestra actividad biológica en las bacterias gram-negativas y gram-positivas a la concentración de trabajo que fue de 2000 µg/ml. Sin embargo, Esto no quiere decir que el aceite en estudio no tenga actividad biológica, sino que, a mayores concentraciones el aceite puede presentar actividad antimicrobiana. Pasa lo contrario en el análisis antifúngico el aceite muestra ligera actividad frente a los hongos destinados para la presente investigación.

No existen estudios específicos sobre actividad microbiana del aceite esencial de *T. terniflora*, sin embargo algunos aceites esenciales de especies de Tagetes han demostrado poseer actividades farmacológicas y antifúngicas; en algunas comunidades se las utiliza con fines medicinales para tratar problemas digestivos, infecciones del tracto urinario o como diurético y antiespasmódico (Visintini Jaime et al., 2013). Esto puede deberse a que en su composición química está presente el compuesto E. Tagetona, compuesto que ejerce un efecto biológico contra plagas y enfermedades (Díaz-Cedillo et al., 2012).

Se sabe que su nombre común en Ecuador es “Chilchi” y en otros países se la conoce como “Quichia”; en nuestro país es utilizada con fines medicinales, para tratar dolores intestinales, malestares estomacales y migrañas. Por otra parte, el aceite esencial ha demostrado bioactividad frente a algunos insectos (Almirón et al., 2013).

CONCLUSIONES

- ❖ Para el estudio de la especie *T. terniflora* se recolectó 12.029 Kg de muestra vegetal durante tres salidas de campo, con un promedio de entre 3.5 y 4.5 Kg durante cada recolección.
- ❖ La humedad medida para esta especie fue de 73.15%, y su rendimiento de 0.72%, con una relación volumen-peso de 0.72 mL/Kg.
- ❖ Los valores encontrados de las propiedades físicas del aceite esencial de *T. terniflora* fueron: Densidad relativa de 0.9398 g/cm³; el valor medio del índice de refracción fue de 1.5142 y la actividad óptica de -0.3415°.
- ❖ En la caracterización química realizada a través del cromatógrafo de gases, se encontraron 21 compuestos. Para la columna DB-5MS se identificaron 9 compuestos como los mayoritarios, que corresponden a un 93.56% de la identificación. Para la columna HP-INNOWAX obtuvo una identificación del 89.68%.
- ❖ Los compuestos con mayor representatividad por arriba de un 5% dentro del conjunto de compuestos fueron: Z Ocimenone (49.80%), Dihydrotagetone (11.85%), E-Ocimenone (11.12%), E-Tagetone (6.68%) y β-Ocimene (5.13%).
- ❖ El compuesto predominante fue Z Ocimenone con un porcentaje de 49.80%.
- ❖ En el análisis de CMI para el aceite de *T. terniflora* no mostró actividad biológica frente a las bacterias Gram-positivas y negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) a una concentración de evaluación máxima de 2000 µg/mL. Caso contrario lo evidenciado en el control realizado en hongos (*Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*), donde el aceite esencial presenta una leve actividad biológica frente a las especies fúngicas utilizados en el estudio.

RECOMENDACIONES

- ❖ Se debe realizar un estudio de la especie *T. terniflora* durante las diferentes etapas de floración, a fin de obtener más información sobre sus metabolitos secundarios y la variación de estos.
- ❖ Realizar un análisis de los componentes químicos de la especie *T. terniflora* y de esta manera poder identificar sus posibles usos a escala medicinal o industrial.
- ❖ Se debería integrar más agentes patógenos de interés en salud pública dentro del análisis de actividad biológica.
- ❖ Se debería realizar análisis de actividad microbiológica a diferentes concentraciones del aceite, de esta manera se podría establecer si el aceite muestra o no actividad frente a ciertos microorganismos y sus posibles usos ante los mismos.

BIBLIOGRAFIA.

- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Allured publishing corporation.
- Alarcón, J. J. (2011). *Plantas aromáticas y medicinales. Enfermedades de importancia y sus usos terapéuticos. Medidas para la temporada invernal* (Produmedios Ed. ICA Instituto colombiano agropecuario ed.). Bogotá - Colombia.
- Albarracín H., W., Alfonso A., C., & Sánchez B., I. C. (2012). Application of Essential Oils as a Preservative to Improve the Shelf Life of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vitae*, 19, 34-40.
- Almirón, E., Stefanzi, N., González, J., & Ferrero, A. (2013). Toxicidad por Contacto y Fumigante del Aceite Esencial de *Tagetes terniflora* (Asteraceae) en *Blattella Germanica* (Blattaria: Blattellidae). *Domingezia*, 144.
- Aricapa, D. (2009). *Actividad Antimicrobiana de Plantas Sobre Microorganismos Cariogénicos*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Arteaga, R. (2011). ¿Especies Vegetales en Peligro de Extinción? *Verd Ecológica - Turística*, 6, 13.
- Baron, S. (1996). *Medical Microbiology* (4th edition ed.). University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Bermúdez, A., Oliveira-Miranda, M. A., & Velázquez, D. (2005). La Investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*, 30, 453-459.
- Blackmore, S., Bramwell, D., Crane, P., Braulio, D., Given, D., & Otros. (2000). *The Gran Canaria Declaration: Calling for a Global Program for Plant Conservation*. Richmond, England: Botanic Gardens Conservation International.
- Blutfield, M., Lohre, J., Pawich, D., & Vlahovic, T. (2015). The Immunologic Response to *Trichophyton Rubrum* in Lower Extremity Fungal Infections. *Journal of Fungi*, 1(2), 130.
- Brooks, G., Carroll, C., Butel, J., Morse, S., & A, M. (2011). *Jawetz, Melnick y Adelberg: Microbiología Médica* (M.-H. Interamericana Ed. 26va ed.).
- Buckle, J. (2014). *Clinical aromatherapy: Essential oils in practice*: Elsevier Health Sciences.
- Celis, Á., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., & Cuca, L. E. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 97 - 106.
- Cercenado, E. (2011). Enterococcus: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(Supl.5), 59-65.
- Chevallier, A. (1996). *Enciclopedia de plantas medicinales*: Acento.
- De Feo, V., Urrunaga Soria, E., Urrunaga Soria, R., & Pizza, C. (2005). Composition and in vitro toxicity of the essential oil of *Tagetes terniflora* HBK.(Asteraceae). *Flavour and Fragrance Journal*, 20(1), 89-92.
- Del Vito, L. A., & Petenatti, E. M. (2009). Asteráceas de importancia económica y ambiental: Primera parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. *Multequina*, 18(2), 87 - 115.
- Dellacassa, E. (2010). *Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática latinoamericana: proyecto CYTED IV. 20*: EdiPUCRS.
- Díaz-Cedillo, F., Serrato-Cruz, M. A., Arce-Montoya, M., & León-de la Luz, J. L. (2012). Composición del aceite esencial de *Tagetes lacera*, planta endémica de Baja California Sur, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83, 543-547.

- Douglas, M., Heyes, J., & Smallfield, B. (2005). *Herbs, spices and essential oils: post-harvest operations in developing countries*: Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO).
- Echeverri Toro, L. M., & Cataño Correa, J. C. (2010). Klebsiella pneumoniae como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. *Iatreia*, 23, 240-249.
- Fahlbusch, K.-G., Hammerschmidt, F.-J., Panten, J., Pickenhagen, W., Schatkowski, D., Bauer, K., . . . Surburg, H. (2000). Flavors and Fragrances *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Fenández, J., Buitrago, D., Velasco, J., Rojas, L., & Morales, A.-. (2008). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pseudognaphalium caeruleocanum* (Steyermark) A. Anderberg. *Rev. Latinoam. Quím*, 36(29 - 35).
- Fernández, R., Segundo, C., Arenas, R., Silva, D. d., & Guzmán, A. (2002). Determinación de las variedades de *Trichophyton mentagrophytes* en 10 casos de dermatofitosis de Paraguay. *Bioquímica*, 41 - 45.
- Flores Guido, J. S., Flores Abuxapqui, J. J., & Pérez Mutul, J. (2009). Las plantas del Nuevo Mundo y su amplísima utilización en la Medicina tradicional desde los tiempos precolombinos. *Revista biomédica - Universidad Autónoma de Yucatán*, 20(1), 1 - 4.
- Flores, M. (2010). *Investigación de los Aceites Esenciales, Sus Características y Finalidad de Uso. Análisis del Estado de su Regulación en Chile y el Mundo.*, Universidad de Chile, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica.
- García-Nieto, L. P. (2000). Las plantas medicinales y aromáticas: Una alternativa de futuro para el desarrollo rural. *Boletín económico de ICE, Información Comercial Española*(2652), 29-39.
- Gerhard, B. (2009). Biological Activities of Essential Oils *Handbook of Essential Oils* (pp. 235-280): CRC Press.
- Ghaidaa, M., Yanchang, W., & Abdallah, H. (2013). The effect of p-nitrophenylglycerol on swarming and the production of some virulence factors in *Proteus vulgaris*. *New York Science Journal*, 6(9), 7.
- González, A. (2004). *Obtención de Aceites Esenciales y Extractos Etanólicos de Plantas del Amazonas*. Universidad Nacional de Colombia, Manizales.
- Gutiérrez, M., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín intexter (upc) Catalunya*.
- Jørgensen, P., Ulloa, C., & Maldonado, C. (2006). Riqueza de plantas vasculares. In M. Moraes, B. Øllgaard, P. Kvist, F. Borchsenius, & H. Balslev (Eds.), *Botánica Económica de los Andes Centrales* (pp. 37 - 50). Universidad Mayor de San Andrés, La Paz.
- Juárez-Rosete, C., Aguilar-Castillo, J., Juárez-Rosete, M., Bugarín-Montoya, R., Juárez-Lopez, P., & Cruz-Crespo, E. (2013). Hierbas aromáticas y medicinales en México: Tradición e innovación. *Revista Bio Ciencias*, 2(3).
- Jurado, R., Muñoz, C., Delgado, A., Rivero, A., & Cisneros, J. (2010). Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. *Medicine: Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 10(52), 3497-3501.
- Kayser, F., Bienz, K., A, Zinkernagel, R., & Eckert, J. (2005). *Medical Microbiology* (10th edición ed.). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Lawless, J. (2013). *The Encyclopedia of Essential Oils: The Complete Guide to the Use of Aromatic Oils In Aromatherapy, Herbalism, Health, and Well Being*: Conari Press.
- Lebeque Pérez, Y., Morris Quevedo, H. J., & Calás Viamonte, N. (2006). Infecciones nosocomiales: incidencia de la *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Cubana de Medicina*, 45, 0-0.

- López Luengo, M. T. (2004). Los aceites esenciales aplicaciones farmacológicas, cosméticas y alimentarias. *OFFARM*, 23, 88 - 91.
- López Vargas, J. A., & Echeverri Toro, L. M. (2010). K. pneumoniae: ¿la nueva "superbacteria"? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. *Iatreia*, 23, 157-165.
- Lucana Nina, M. R., & Huanca Espinoza, R. M. (2014). Estructura Bacterina. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, 49, 2589-2593.
- Luna, H. (2007). *Obtención, Caracterización y Estudio de la Desterpenación del Aceite Esencial de Naranja (Citrus sinensis)*. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga. (2000510)
- Lloria, M. (2009). Infecciones por Pseudomonas aeruginosa *Manejo de las Infecciones por Organismos Multirresistentes*.
- Martínez, A. (1996). Aceites esenciales. *J. Nat. Prod*, 59(1), 77-79.
- Molares, S., González, S., Ladio, A., & Castro, M. A. (2009). Etnobotánica, anatomía y caracterización físico-química del aceite esencial de Baccharis obovata Hook. et Arn.(Asteraceae: Astereae). *Acta Bot Bras*, 23(2), 578-589.
- Murillo, M. C. Á., Suarez, L. E. C., & Salamanca, J. A. C. (2014). Actividad insecticida sobre Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) de los compuestos aislados de la parte aérea de Piper septuplinervium (Miq.) c. dc. y las inflorescencias de Piper subtomentosum Trel. & Yunck. (Piperaceae). *Química Nova*, 37, 442-446.
- NaturAEsen. (2006). *Introducción a la Industria de los Aceites Esenciales extraídos de Plantas Medicinales y Aromáticas* (SENA Ed.). Manizales.
- Ochoa, S. A., López-Montiel, F., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L. B., López-Martínez, B., . . . Xicohtencatl-Cortes, J. (2013). Características patogénicas de cepas de Pseudomonas aeruginosa resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 70, 136-150.
- Ordaz, G., D Armas, H., Yáñez, D., & Moreno, S. (2011). Composición química de los aceites esenciales de las hojas de Helicteres guazumifolia (Sterculiaceae), Piper tuberculatum (Piperaceae), Scoparia dulcis (Arecaceae) y Solanum subinerme (Solanaceae), recolectadas en Sucre, Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 59, 585-595.
- Ortiz Bode, T. T. (2013). VARIABILIDAD DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE LA ESPECIE Petiveria alliacea Linn EN EL PERÍODO octubre de 2010–enero de 2011. *Revista CENIC : Ciencias Biológicas*(44).
- Peredo-Luna, H. A., Palou-García, E., & López-Malo, A. (2009). Aceites Esenciales: Metodos de Extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3, 24 - 32.
- Puerta-García, A., & Mateos-Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 10(51), 3426-3431.
- Redonda-Martínez, R., & Villasenor-Rios, J. L. (2011). Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán: Asteraceae. *Instituto de Biología. Departamento de Botánica*(89).
- Restrepo, D., Díaz, J., Betancur, R., Martínez, M., & Otros. (2013). *Cultivo y producción de plantas aromáticas y medicinales* (F. E. U. C. d. Oriente Ed. 2da ed.). Antioquia - Colombia.
- Rios, E., Giraldo, G., León, D., & Moreno, A. (2008). Estudio del Perfil de Compuestos Volátiles de los Rizomas de Curcuma longa L. Cultivada en el Departamento del Quindío - Colombia. *Revista de Investigación Universitaria Quindío*, 37.
- Rivera, D. (2008). *Caracterización de Aceites Esenciales por Cromatografía de Gases de Tres Especies del Género Piper y Evaluación de la Actividad Citotóxica*. Universidad de San Carlos, Guatemala.

- Rivera, L., & Solano, R. (2009). *Hidrodestilación y Caracterización del Aceite Esencial de Plantas Medicinales de Santa María Huipitec, Oaxaca*. Instituto Politécnico Nacional, Oaxaca de Juárez.
- Rivera, S. P. G., Cardozo, R., & García, V. (2004). Desarrollo agrotecnológico de *Lippia alba* (Miller) NE Brown ex Britton & Wilson. *Revista Guillermo de Ockham*, 2(1), 201-215.
- Rodríguez-Álvarez, M., Alcaráz-Meléndez, L., & Real-Cosío, S. (2012). *Procedimientos Para la Extracción de Aceites Esenciales en Plantas Aromáticas*. S.C. La Paz, Baja California Sur.
- Rueda, X. Y., Conde, C. G., & Lengua, M. D. (2013). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Myrcianthes leucoxyla* de Pamplona (Colombia). @ *limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 11(1).
- Sánchez, M. F. O. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes: Aiyana*.
- Sanz, E. (07/11). Las Plantas del Mundo Reunidas en una Lista. Retrieved from <http://www.muyinteresante.es/ciencia/articulo/las-plantas-del-mundo-reunidas-en-una-lista>
- Stashenko, E. (2009). *Aceites Esenciales*. Universidad Industrial de Santander.
- Stefanazzi, N., Gutierrez, M., Stadler, T., Bonini, A., & Ferrero, A. (2006). Actividad biológica del aceite esencial de *Tagetes terniflora* Kunth (Asteraceae) en *Tribolium castaneum* Herbst (Insecta, Coleoptera, Tenebrionidae). *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, 32(3), 439-447.
- Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., & Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food chemistry*, 90(3), 333-340.
- Torres, L. d. I. (2008). *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador* (1ra ed.). Quito.
- Valencia, R. (2000). *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador*. Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Vargas, A., & Bottia, E. (2008). Estudio de la composición química de los aceites esenciales de seis especies vegetales cultivadas en los municipios de Bolívar y El Peñón–Santander, Colombia. *Proyecto de grado, Universidad Industrial de Santander Facultad de Ciencias, Escuela de Química*.
- Visintini Jaime, M. F., Redko, F., Muschietti, L. V., Campos, R. H., Martino, V. S., & Cavallaro, L. V. (2013). In vitro antiviral activity of plant extracts from Asteraceae medicinal plants. *Virology*, 10, 245. doi:10.1186/1743-422X-10-245
- Yumi Mullo, J. N. (2011). *Determinación de la actividad insecticida de los aceites esenciales de Tagetes minuta, Tagetes terniflora y Tagetes zipaquirensis en Brevicoryne brassicae*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba - Ecuador.

ANEXOS

ANEXO I

DETERMINACIÓN DE LA 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 g de la muestra; seguidamente colocarla durante 45 minutos en la lámpara ULTRAX a 37°C.
- Enfriar la cápsula en el desecador por 5 minutos aprox., 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:

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

Donde:

Hm: % de humedad

m: peso de la cápsula vacía (g)

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

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

ANEXO II

DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO

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

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

Donde:

R: % de rendimiento.

V: volumen del aceite extraído (mL)

P: peso de la materia vegetal empleada en la destilación (Kg).

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

Según la AFNOR NF T 75 – 111 JUNIO 1982

PROPUESTA:

El presente método está basado 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 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 $20\text{ °C} \pm 0.2\text{ °C}$.
- Termómetro de precisión graduado de 10 a 30 °C , con una variación de 0.2 °C a 0.1 °C .
- Balanza analítica.

PROCEDIMIENTO:

- **Preparación del picnómetro:** limpiar rigurosamente y luego enjuagar el picnómetro, lavar con etanol y luego con acetona, pasarlo por una corriente de aire seco. Si es necesario limpiar el 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 un mg 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 balanza, pesar el picnómetro lleno con el tapón en su sitio con 1 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)

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

Donde:

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 gramo 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 utilicen, 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: utilice 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 .

Ajuste el aparato de manera que, a una temperatura de 20 °C, se tenga 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 la refractometría, deben también ajustarse con una lámina de índice de refracción conocida, según las indicaciones de fábrica 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 ± 0.2 °C y debe mantenerse a ± 0.2 °C.

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

Resultados:

Cálculos: el índice de refracción a la temperatura de referencia está dado por la fórmula (6)

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

Donde:

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 de aceite.

DEFINICIONES:

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

Ángulo expresado en mili radianes y/o grados de ángulo descrito por la polarización plana de una radiación luminosa cuya longitud de onda es 589.3 ± 0.3 nm, correspondiente a las D líneas de sodio, cuando el trayecto de la luz atraviesa 100 nm 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 con el espesor de 100 nm. También la medida acordada por el Faraday magneto – óptico en principio es posible. El espesor de la muestra en este caso es de 10 nm.

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 ± 0.5 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 26 g de sacarosa anhidra en 200 mm de pasta a una temperatura de 20°C . El instrumento deberá ser utilizado en la obscuridad.

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 $100\text{ nm}\pm 0.5\text{ nm}$ de longitud. Para muestras ligeramente coloreadas o de baja rotación óptica se deben usar tubos de más o menos $200\text{ nm}\pm 0.5\text{ nm}$, tubos de $50\text{ nm}\pm 0.5\text{ nm}$ o $10\text{ nm}\pm 0.5\text{ nm}$ 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 20°C y 30°C .

PROCEDIMIENTO:

Es necesario mantener la temperatura de la muestra a $20^\circ\text{C}\pm 0.2^\circ\text{C}$ o especificar la temperatura, para la muestra que va en el tubo polarímetro 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.

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

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

l = es la longitud del tubo usado en nm.

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 con el 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 miliradianes o grados del ángulo está dada por la ecuación 8.

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

Donde:

A'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.

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

Donde:

α = Actividad óptica calculada.

α_l = Actividad óptica leída.

l = Dimensión del tubo (dm)=1.

α_s = Actividad óptica del solvente=0.00 o Z.

c = Concentración muestra (gr/ml).

ANEXO VI

INDICE DE KOVATS

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

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

Donde:

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 en la no polar, valores que se compararon con los reportados por Adams (Adams, 2009), bases de datos electrónicos 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.

ANEXO VII
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS INDICE DE KOVATS

^bref.1; ^cref.2; ^dref.3; ^eref.4; ^fref.5 ^gref.6; ^href.7; ⁱref.8; ^jref.9; ^kref.10; ^lref.11; ^mref.12; ⁿref.13;
^oref.14; ^pref.15. ^qref.16; ^rref.17; ^sref.18; ^tref.19; ^uref.20; ^vref.21; ^wref.22

1. Adams, R. (2009) Identification of Esencial oil components by chromatography/ MS Spectrometry. Vol 4.
2. Adams, R.P.; Morris, J.A.; Pandey, R.N.; Schwarzbach, A.E., Cryptic speciation between *Juniperus deltoides* and *Juniperus oxycedrus* (Cupressaceae) in the Mediterranean, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2005, 33, 8, 771-787.
3. Lucero, M.E.; Fredrickson, E.L.; Estell, R.E.; Morrison, A.A.; Richman, D.B., Volatile Composition of *Gutierrezia sarothrae* (Broom Snakeweed) as Determined by Steam Distillation and Solid Phase Microextraction, *J. Essent. Oil Res.*, 2006, 18, 2, 121-125.
4. Boukhris, M.; Bouaziz, M.; Feki, I.; Jemai, H.; El Feki, A.; Sayadi, S., Hypoglycemic and antioxidant effects of leaf essential oil of *Pelargonium graveolens* L'Her. in alloxan induced diabetic rats, *Lipids in Health and Disease*, 2012, 11, 1, 1-10.
5. Senatore, F.; Apostolides Arnold, N.; Bruno, M., Volatile components of *Centaurea eryngioides* Lam. and *Centaurea liberica* Trev. var. *hermonis* Boiss. Lam., two Asteraceae growing wild in Lebanon, *Nat. Prod. Res.*, 2005, 19, 8, 749-754.
6. Morteza-Semnani, K.; Saeedi, M.; Akbarzadeh, M., Essential oil composition of *Teucrium scordium* L., *Acta Pharm.*, 2007, 57, 4, 499-504.
7. Morteza-Semnani, K.; Saeedi, M., The essential oil composition of *Phlomis brugueri* Desf. from Iran, *Flavour Fragr. J.*, 2005, 20, 3, 344-346.
8. Viña, A.; Murillo, E., Essential oil composition from twelve varieties of basil (*Ocimum* spp) grown in Columbia, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2003, 14, 5, 744-749.
9. Yáñez, X.; Pinzón, M.L.; Solano, F.; Sánchez, L.R., Chemical composition of the essential oil of *Psidium caudatum* McVaugh, *Molecules*, 2002, 7, 9, 712-716.
10. Rega, B.; Fournier, N.; Nicklaus, S.; Guichard, E., Role of pulp in flavor release and sensory perception in orange juice, *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 13, 4204-4212.
11. Pala-Paul, J.; Brophy, J.J.; Perez-Alonso, M.J.; Usano, J.; Soria, S.C., Essential oil composition of the different parts of *Eryngium corniculatum* Lam. (Apiaceae) from Spain, *J. Chromatogr. A*, 2007, 1175, 2, 289-293.

12. Viljoen, A.M.; Subramoney, S.; van Vuuren, S.F.; Baser, K.H.C.; Demirci, B., The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils, *J. Ethnopharmacol.*, 2005, 96, 1-2, 271-277.
13. Pena, R.M.; Barciela, J.; Herrero, C.; Garcia-Martin, S., Optimization of solid-phase microextraction methods for GC-MS determination of terpenes in wine, *J. Sci. Food Agric.*, 2005, 85, 7, 1227-1234.
14. Njoroge, S.M.; Koaze, H.; Karanja, P.N.; Sawamura, M., Volatile Constituents of Redblush Grapefruit (*Citrus paradisi*) and Pummelo (*Citrus grandis*) Peel Essential Oils from Kenya, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 25, 9790-9794.
15. Weyerstahl, P.; Marschall, H.; Weirauch, M.; Thefeld, K.; Surburg, H., Constituents of commercial Labdanum oil, *Flavour Fragr. J.*, 1998, 13, 5, 295-318.
16. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5368956#section=Computed-Properties>.
17. Viña, A.; Murillo, E., Essential oil composition from twelve varieties of basil (*Ocimum* spp) grown in Columbia, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2003, 14, 5, 744-749.
18. Vinogradov, B.A., Production, composition, properties, and application of essential oils, 2004.
19. Ferhat, M.A.; Tigrine-Kordjani, N.; Chemat, S.; Meklati, B.Y.; Chemat, F., Rapid Extraction of Volatile Compounds Using a New Simultaneous Microwave Distillation: Solvent Extraction Device, *Chromatographia*, 2007, 65, 3-4, 217-222.
20. Stashenco, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R. (2003). Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Rev. Acad. Colomb. Cienc*, 27(105), 579-597.
21. Sevim Alan, Mine Kürkçüoğlu, Temel Ozek & K. Hüsnü Can Başer (2009) Composition of the Essential Oils of *Calamintha tauricola* P.H. Davis, *Journal of Essential Oil Research*, 21:2, 143-145.
22. Ismail Amri, Lamia Hamrouni, Mohsen Hanana, Samia Gargouri, Tarek Fezzani & Bassem Jamoussi (2013) Chemical composition, physico-chemical properties, antifungal and herbicidal activities of *Pinus halepensis* Miller essential oils, *Biological Agriculture & Horticulture: An International Journal for Sustainable Production Systems*, 29:2, 91-106.