



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

AREA BIOLÓGICA Y BIOMÈDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

Determinación de las propiedades físicas, composición química y evaluación de la actividad biológica y antioxidante del aceite esencial de *Zingiber officinale*

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Ortiz Rodriguez, Dayanara Elizabeth

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: **Determinación de las propiedades físicas, composición química y evaluación de la actividad biológica y antioxidante del aceite esencial de *Zingiber officinale***, realizado por Dayanara Elizabeth Ortiz Rodriguez, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, abril de 2018

f.....

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Dayanara Elizabeth Ortiz Rodriguez, declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: **Determinación de las propiedades físicas, composición química y evaluación de la actividad biológica y antioxidante del aceite esencial de *Zingiber officinale***, de la titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Benito Eduardo Valarezo Valdez director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de exclusiva responsabilidad.

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

f.....

Autora: Dayanara Elizabeth Ortiz Rodríguez

Cédula: 1103837413

DEDICATORIA

A ti abuelita querida que un día abriste tus brazos y tu corazón para que yo entrara en él y desde ese momento convertirte en mi pilar fundamental, a ti que un día me recibiste como tuya para moldearme bajo tu amor, a ti que cuando desfallecía al cansancio me animaste a continuar este camino que emprendí, a ti que sin decir una sola palabra y tan solo mostrar tu sonrisa me dabas fuerza y esperanza en mis momentos difíciles, a ti que eres mi fortaleza, mi alegría y mi bastón.

A ti madre mía, que me albergaste en tu vientre, a ti que eres mi guía desde el cielo, a ti que cuidas mi caminar, a ti que dejaste tu vida a un lado y comenzaste a vivir la mía, a ti madre querida que eres mi ángel más amado, a ti que eres el más grande ejemplo de perseverancia, humildad y sencillez, a ti mi amada madre con todo mi corazón.

Dayanara Ortiz

AGRADECIMIENTO

A Dios primeramente por haberme permitido culminar esta etapa de mi vida, por haberme dado la salud necesaria para lograr mis objetivos planteados, además de su infinita bondad y amor.

Agradezco también la confianza y el apoyo brindado por parte de mi abuelita, que sin duda alguna en todo el trayecto de mi vida me ha demostrado su amor, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos.

A mi Madre por haberme dado el mejor ejemplo de vida.

A mi familia que de una u otra manera me impulsaron para seguir luchando en las dificultades que se me presentaron.

A mis amigas que caminaron junto a mí en este trayecto universitario, que me brindaron su apoyo, sus conocimientos y su amistad sincera, las llevo en mi corazón.

De manera especial a mi director de tesis Ph.D Eduardo Valarezo Valdez, por haberme brindado un espacio en su selecto grupo de trabajo, por su ayuda, comprensión en momentos difíciles y sobre todo por su motivación para avanzar en el objetivo planteado, gracias por su sencillez y amabilidad. Dios le pague infinitamente.

Gracias infinitas a todos los que me acompañaron en este largo caminar.

Dayanara Ortiz

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARATULA	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	4
1. MARCO TEÓRICO	4
1.1. Aceites esenciales	5
1.1.1. Clasificación de los aceites esenciales.....	5
1.1.2. Características químicas de los aceites esenciales.....	6
1.1.3. Características físicas de los aceites esenciales.....	6
1.1.4. Propiedades terapéuticas.....	6
1.1.5. Vías de administración de los aceites esenciales.....	7
1.2. Cromatografía de gases.....	7
1.2.2. Aplicaciones de la cromatografía de gases.....	9
1.2.3. Ventajas y desventajas.....	9
1.3. Actividad Biológica.....	9
1.3.1. Bacteria.....	10
1.3.2. Bacterias Gram-Negativas.....	11
1.3.2.1. <i>Escherichia coli</i>	12
1.3.3. Bacterias Gram- Positivas.....	12
1.3.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	13
1.3.3.2. <i>Micrococcus luteus</i>	13
1.3.3.3. <i>Enterococcus faecalis</i>	14
1.3.4. Hongos.....	14
1.3.4.1. <i>Candida albicans</i>	16
1.4. Actividad antioxidante	16
1.4.1. Método ABTS (2,2-azinobis; ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).....	17

1.4.2. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).....	17
1.5. Plantas medicinales.....	17
1.6. Flora Ecuatoriana.....	18
1.6.1. Flora aromática de Ecuador.....	19
1.7. La familia <i>Zingiberaceae</i>	20
1.7.1. Zingiber.....	21
1.7.1.1. <i>Zingiber officinale</i>	21
1.7.1.2. <i>Taxonomía de la especie Zingiber officinale</i>	22
CAPITULO II.....	23
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
2.1. Muestras.....	24
2.2. Determinación de las propiedades físicas.....	24
2.2.1. Densidad relativa.....	24
2.2.2. Índice de refracción.....	24
2.2.3. Actividad óptica.....	24
2.3. Determinación de la composición química del aceite esencial.....	25
2.3.1. Cromatografía de gases.....	25
2.3.1.1. <i>Preparación de la muestra</i>	25
2.3.1.2. <i>Análisis del aceite esencial por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y al detector de ionización de llama</i>	25
2.3.2. Identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos químicos del aceite esencial de <i>Zingiber officinale</i> , tanto en la columna polar como en la columna no polar. .	29
2.4. Determinación de la actividad biológica del aceite esencial de <i>Z. officinale</i>	31
2.4.1. Actividad antimicrobiana.....	31
2.4.1.1. <i>Método microdilución en caldo</i>	31
2.4.1.2. <i>Preparación de la muestra</i>	32
2.4.1.3. <i>Preparación del cultivo bacteriano “Cultivo Overnight”</i>	32
2.4.2. Actividad antifúngica.....	34
2.4.2.1. <i>Método de Microdilución en caldo</i>	34
2.4.2.2. <i>Preparación de la muestra</i>	34
2.5. Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Z. officinale</i>	34
2.5.1. Preparación de la muestra.....	35
2.5.2. Método capacidad de atrapamiento del catión – radical ABTS ⁺	35
2.5.3 Método radical DPPH.....	36
2.5.4. Análisis de los datos obtenidos mediante ABTS ⁺ y DPPH.....	37
CAPITULO III.....	38

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
3.1. Determinación de las propiedades físicas del aceite esencial de <i>Z. officinale</i>	39
3.1.1. Densidad.....	39
3.1.2. Índice de refracción.....	40
3.1.3. Actividad Óptica específica.....	40
3.2. Composición química del aceite esencial de <i>Zingiber officinale</i>	41
3.2.1. Análisis cualitativo y cuantitativo.....	41
3.3.1. Concentración mínima Inhibitoria (CMI) antibacteriana.....	55
3.4. Actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Z. officinale</i>	57
3.4.1. Método ABTS ⁺	57
3.4.2. Método DPPH.....	58
CONCLUSIONES.....	60
RECOMENDACIONES.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	62
ANEXOS.....	69
ANEXO I.....	70
DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA A 20°C.....	70
DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN.....	72
ANEXO III.....	74
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ÓPTICA.....	74
ANEXO IV.....	77
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA DE LOS ÍNDICE DE KOVATS.....	77
ANEXO V.....	78
INDICE DE KOVATS.....	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Orden taxonómico de la especie de <i>Zingiber officinale</i>	22
Tabla 2. Cepas Bacterianas utilizadas	31
Tabla 3. Medios de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada bacteria.	32
Tabla 4. Volumen utilizado para cada dilución del aceite	35
Tabla 5. Volumen necesario para cada dilución de Trolox y BTH	36
Tabla 6. Densidad relativa del aceite de <i>Z. officinale</i>	39
Tabla 7. Índice de refracción del aceite esencial de <i>Z. officinale</i>	40
Tabla 8. Actividad óptica específica del aceite esencial de <i>Z. officinale</i>	41
Tabla 9. Composición química del aceite esencial de <i>Z. officinale</i>	45
Tabla 10. Comparación de la cantidad relativa (%) de los compuestos químicos del aceite esencial por CG-MS y CG-FID	50
Tabla 11. Concentración mínima inhibitoria (ug/mL) de las muestras del aceite esencial de Z.O	55
Tabla 12. Datos del método ABTS ⁺ para el aceite esencial	57
Tabla 13. Datos del método DPPH para los estándares TROLOX.	58
Tabla 14. Datos de absorbancias medias y porcentaje de disminución del aceite esencial de <i>Zingiber officinale</i> por el método DPPH.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Componentes principales que forman parte del Cromatógrafo de gases	8
Figura 2.	Estructura de las bacterias Gram positivas y Gram negativas	11
Figura 3.	<i>E. coli</i>	12
Figura 4.	<i>S. aureus</i>	13
Figura 5.	<i>M.luteus</i>	13
Figura 6.	<i>E.faecalis</i>	14
Figura 7.	Estructura de hifa	15
Figura 8.	Estructura de la levadura	15
Figura 9.	Tipos de hifa	15
Figura 10.	Colonias filamentosas y levaduriformes	15
Figura 11.	<i>Candida albicans</i>	16
Figura 12.	Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna no polar DB-5MS	26
Figura 13.	Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en columna polar HP-INNOWAX acoplado a espectrometría de masas.	27
Figura 14.	Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en columna no polar DB-5MS, acoplada al detector de ionización en llama (FID).	28
Figura 15.	Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en columna polar HP-INNOWAX acoplada al detector de ionización en llama (FID).....	29
Figura 16.	Perfil cromatográfico del aceite esencial de <i>Zingiber officinale</i> en la columna no polar DB-5MS.	42
Figura 17.	Perfil cromatográfico del aceite esencial de <i>Zingiber officinale</i> en la columna polar HP-INNOWAX.	42
Figura 18.	Compuestos mayoritarios en la columna no polar (DB5-ms)	48
Figura 19.	Compuestos mayoritarios en la columna polar HP-Innowax.....	49
Figura 20.	Compuestos mayoritarios en la columna no polar (DB5-FID)	53
Figura 21.	Compuestos mayoritarios en la columna polar (HP-Innowax-FID)	53

RESUMEN

El aceite esencial de *Zingiber officinale* se obtuvo mediante hidrodestilación, la composición química del aceite esencial se determinó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y al detector de ionización de llama. La actividad biológica fue evaluada por el método de microdilución en caldo y la actividad antioxidante mediante dos métodos espectrofotométricos ABTS⁺ y DPPH. Así mismo se determinó las propiedades físicas del aceite esencial. Se identificaron 41 compuestos que representan un 98,65% del aceite esencial de *Zingiber officinale*, los componentes más representativos fueron: Zingiberene (23,32%), Geraniol (10,26%), β- Sesquiphellandrene (8,03%), Camphene (7,41%), Neral (6,62%), Curcumene (6,21%), E, E α-Farnesene (5,66). La densidad del aceite esencial de *Z. officinale* fue de 0,8846 g/cm³, el índice de refracción fue de 1,4847 y la actividad óptica fue de -12,109. El aceite esencial no reveló actividad antibacteriana, pero sí actividad antifúngica con un CMI de 1250 ug/mL frente a *Candida albicans* (ATCC 26555). El aceite esencial presentó también una fuerte actividad antioxidante frente al método ABTS⁺ alcanzando un IC₅₀ de 1,47 mg/mL, e igualmente para DPPH con IC₅₀ de 11,425 mg/mL.

PALABRAS CLAVES: *Zingiber officinale*, aceite esencial, CG-EM, DPPH, ABTS⁺, CMI.

ABSTRACT

The essential oil *Zingiber officinale* was obtained by hydro distillation, the chemical composition of the oil was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry and the flame ionization detector. The biological activity was evaluated by the broth microdilution method and the antioxidant activity by two spectrophotometric methods ABTS+ and DPPH. Likewise, the physical properties of the essential oil were determined. We identified 41 compounds representing 98.65% of the essential oil, the most representative components were: Zingiberene (23.32%), Geraniol (10.26%), β - Sesquiphellandrene (8.03%), Camphene (7.41%), Neral (6.62) %, Curcumene (6.21%), E, E α -Farnesene (5.66). The density of the essential oil *Zingiber officinale* was 0.8846 g / cm³, the refractive index was 1.4847 and the optical activity was -12.109. The essential oil did not reveal antibacterial activity, but did show antifungal activity with a MIC of 1250 ug/mL against *Candida albicans* (ATCC 26555). The essential oil presented a strong antioxidant activity against the ABTS+ method reaching an IC₅₀ of 1.47 mg/mL, and also for DPPH with IC₅₀ of 11,425 mg/ml.

KEY WORDS: *Zingiber officinale*, essential oil, CG - EM, DPPH, ABTS +, CMI

INTRODUCCIÓN

El presente proyecto se desarrolló en la Sección de Ingeniería de Procesos de la Universidad Técnica Particular de Loja; el mismo que constituye en la investigación de las propiedades físicas, composición química, evaluación de la actividad biológica y antioxidante del aceite esencial de la especie *Zingiber officinale* obtenido mediante hidrodestilación. El estudio se desarrolló en tres capítulos; divididos respectivamente en diferentes secciones; el primer capítulo comprende el marco teórico que engloba información de la especie de interés, así como las diferentes técnicas aplicadas para llegar a los resultados, el segundo capítulo contiene el procedimiento y material empleado en el desarrollo de la investigación, y en el último capítulo visualizaremos los resultados obtenidos y el análisis de los mismos logrando así de esta forma llegar a los objetivos planteados al inicio del proyecto. Con este estudio lograremos proporcionar información útil acerca de *Zingiber officinale*, la cual puede ser aplicada para diferentes industrias, como en el campo farmacéutico por sus componentes y propiedades químicas, así como la industria de alimentos elaborando especias de dicho aceite esencial.

El objetivo general del proyecto es determinar las propiedades fisicoquímicas, así también como la evaluación de la actividad biológica y la actividad antioxidante de la especie en estudio. Tratamos como objetivos específicos la identificación química del aceite esencial mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-EM) y al detector de ionización de llama (GC-FID. También la identificación de las propiedades físicas como: densidad relativa, el índice de refracción y actividad óptica, determinar la concentración mínima inhibitoria con la finalidad de establecer la actividad biológica frente a bacterias a una baja concentración; y así mismo analizar la actividad antioxidante para la elaboración de productos medicinales.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Aceites esenciales.

Los aceites esenciales son mezclas que se caracterizan por su composición química variada y su aroma, generalmente obtenidos de plantas aromáticas a través de métodos de destilación (Ortuño M. , 2006).

Se definen, según AFNOR (1998), como:

“Productos obtenidos a partir de una materia prima vegetal, bien por arrastre con vapor, bien por procedimientos mecánicos a partir del epicarpio de los Citrus, o bien por destilación seca. El aceite esencial se separa posteriormente de la fase acuosa por procedimientos físicos en los dos primeros modos de obtención; puede sufrir tratamientos físicos que no originen cambios significativos en su composición”

Los aceites esenciales son generalmente líquidos, compuestos por terpenos con actividad y composición variada, se obtienen como producto final del metabolismo secundario de plantas aromáticas (Alzamora et al, 2001).

La extracción de los aceites esenciales se puede dar de diferentes plantas así también como de diferentes partes de ellas; especialmente de las hojas, o también del tallo y de sus semillas; estos pueden ser utilizados para varios campos como el culinario con la elaboración de especias, cosmetología en la producción de perfumes y en el ámbito farmacéutico (Ryman, 1995).

1.1.1. Clasificación de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales se clasifican de acuerdo a su consistencia, origen y naturaleza química. Con respecto a su consistencia pueden ser esencias fluidas que son líquidos volátiles a temperatura ambiente, bálsamos de consistencia más espesa y poco volátiles y oleorresinas muy líquidas y viscosas. De acuerdo a su origen se clasifican en: naturales obtenidos directamente de la planta, artificiales que se obtienen a través de procesos de enriquecimiento y sintéticos producidos por síntesis química. Desde el punto de vista químico se clasifican de acuerdo a sus componentes mayoritarios: monoterpenoides, sesquiterpenoides, fenilpropanoides (Martinez, 2001).

1.1.2. Características químicas de los aceites esenciales.

Los componentes de los aceites esenciales se pueden clasificar en compuestos no terpenoides que son sustancias alifáticas de cadena corta, sustancias aromáticas, sustancias nitrogenadas y en compuestos terpenoides que son los más importantes en cuanto a propiedades y comercialmente (Bruneton, 2001).

Según Pengelly, 1996. Los grupos funcionales que pueden poseer son:

- Alcoholes (mentol, bisabol)
- Fenol (timol, carvacol)
- Aldehídos (geraniol)
- Cetonas (alcanfor)
- Ésteres (acetato de linlilo, salcicato de metilo)
- Éteres (cienol)
- Peróxidos (ascaridol)
- Hidrocarburos (limoneno, α y β pineno)

1.1.3. Características físicas de los aceites esenciales.

De acuerdo a Ginkel, 2003. Los aceites esenciales son:

- Volátiles y líquidos a temperatura ambiente
- Recién destilados son incoloros
- Densidad inferior a la del agua
- Índice de refracción elevado
- Liposolubles
- Solubles en alcoholes y diluyentes orgánicos
- Poco solubles en agua

1.1.4. Propiedades terapéuticas.

Los aceites esenciales poseen diversas acciones desde el punto de vista farmacológico debido a la heterogeneidad de moléculas que lo conforman; motivo por el cual al observar sus efectos también son muy utilizados en la cosmetología, y en la aromaterapia ; por otro lado desde el punto de vista toxicológico los aceites esenciales pueden llegar a ser sustancias

potencialmente tóxicas si se aplica en dosis altas, es por eso que el uso o consumo debe ser controlado ya que pueden poseer compuestos que son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica afectando directamente al sistema nervioso central (Whichello, 2005).

Entre las acciones farmacológicas más relevantes mencionamos:

- Poder antiséptico: Presentan poder antiséptico frente a un gran número de bacterias perjudiciales a la salud de las personas, incluso a cepas antibiorresistentes, puede también presentar acción antifúngica frente a hongos patógenos responsables de un gran número de micosis
- Acción espasmolítica y sedante: disminuyen o suprimen los espasmos gastrointestinales, debido a que potencian la secreción gástrica.
- Otras: acción antirreumática, antiinflamatoria y antiflogística (López M. , 2001).

1.1.5. Vías de administración de los aceites esenciales.

Según Castillo & Martínez., 2016, los aceites esenciales se pueden administrar:

- Por inhalación: efecto relajante para la ansiedad y el estrés, para gripes, resfriados, sanear el ambiente y ahuyentar insectos
- Por vía oral: para tratar infecciones intestinales, urinarias, vaginales, respiratorias, etc.
- Por vía cutánea: en masajes relajantes, lesiones musculares problemas de circulación drenaje linfático y tratamientos de belleza corporal.

1.2. Cromatografía de gases.

Es una técnica antigua desarrollada hace cinco décadas atrás, inicialmente se empleó para descomposición de compuestos volátiles al ser sometidos a calor, en la actualidad se lo utiliza para análisis de polímeros que al encontrarse frente a altas temperaturas producen monómeros volátiles. Se considera como un método físico de separación de componentes, los mismos que son distribuidos en dos fases: una fase móvil que se mueve en dirección definida y otra fase fija y separada por diferentes tasas de migración. Según su utilidad se clasifica en: analítica para determinar los compuestos químicos y la concentración en una mezcla; y preparativa para purificar grandes cantidades de químicos (Barquero, 2006).

La fase móvil de la mezcla se encuentra formada por el compuesto deseado en el solvente que por lo general es un gas inerte como el helio, nitrógeno o hidrogeno a través de una fase estacionaria que se encuentra foja en la columna. La fase fija o estacionaria retrasa el paso de los compuestos de la muestra tratada, de manera que los componentes la atraviesan a diferentes velocidades y se separan en un tiempo determinado. Cada uno de los componentes de la muestra presenta un tiempo específico de paso por el sistema el mismo que se lo denomina tiempo de retención (Gutiérrez, 2002).

Para obtener una exitosa aplicación de esta técnica se requiere una selección cuidadosa de columnas cromatograficas empleadas, por lo general existen de dos tipos las empaquetadas y las tubulares, las mismas que varían desde 2 hasta 50m. Así mismo existen los sistemas de detección aplicados a cromatografía donde los más usados son ionización de llama (FID) que responde al número de átomos de carbono que entra en el detector por unidad de tiempo y espectroscopia de masas (MS) (Narváez at al, 2005).

1.2.1. Partes del Cromatógrafo.

Los componentes principales que forman parte de un cromatógrafo de gases los podemos visualizar en la fig.1

- Fuente de gas
- Sistema de inyección
- Horno y columna cromatográfica
- Sistema de detección
- Sistema de registro (Parrales et al , 2012)

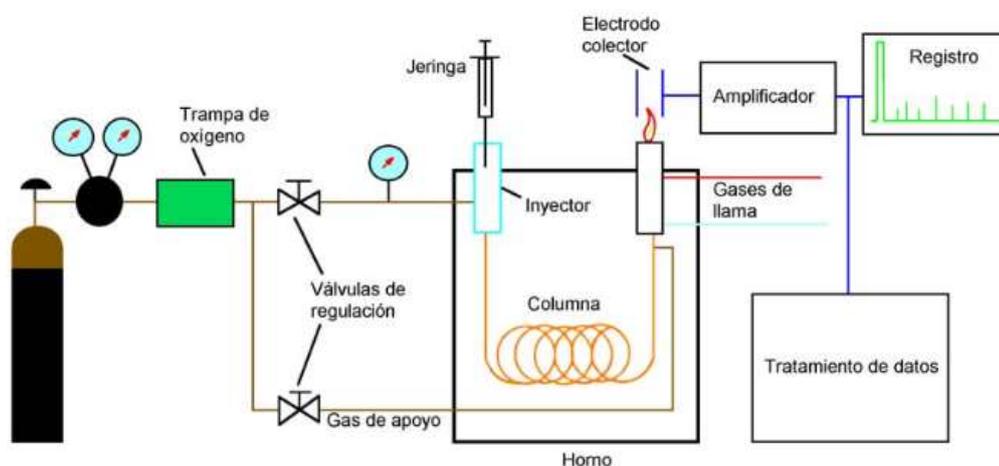


Figura 1. Componentes principales que forman parte del Cromatógrafo de gases
Fuente y elaboración: (Márques, 2015)

1.2.2. Aplicaciones de la cromatografía de gases.

De acuerdo a Olgúin & Rodríguez, 2004 la cromatografía de gases se puede ver empleada en la actualidad en muchos ámbitos cotidianos como se puede recalcar:

- Comida, sabores y fragancias: Productos naturales y las feromonas, análisis de pesticidas.
- Petróleo y químicos: Ácidos grasos, combustibles sintéticos, carbón y aceites.
- Ambientales: Contaminantes de agua, aire y tierra.
- Médicas y biológicas: niveles de alcohol y drogas en la sangre.

1.2.3. Ventajas y desventajas.

De acuerdo a Gutierréz & Droguet, 2002 la cromatografía de gases presenta:

Ventajas:

- La cromatografía dispone de detectores mucho más universales.
- Para diversas aplicaciones, los métodos son más simples, más rápidos y más sensibles.
- La instrumentación requerida es más sencilla y más económica frente a otros aparatos.

Desventajas:

- La influencia de la temperatura sobre la distribución del equilibrio es un punto considerable ya que por ello puede presentar algunas limitaciones como en:
 - Compuestos poco volátiles
 - Compuestos sensibles a una elevación de temperatura
 - Compuestos que se encuentran en forma iónica

1.3. Actividad Biológica.

Los productos naturales obtenidos de plantas aromáticas o medicinales han sido utilizados ampliamente desde hace muchos años atrás, ya sea de forma alimenticia, medicinal o como agente conservante. Hoy en día los consumidores han percibido que dichos compuestos son

más inocuos y por eso los prefieren, ha crecido su uso y consumo, motivo por el cual existen un desarrollo importante de la agroindustria de plantas naturales y medicinales (Castañeda et al , 2007).

Los aceites esenciales presentan bioactividades importantes como propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes, siendo así de mucho interés por sectores o industrias importantes como la farmacéutica, de perfumes, cosmética y alimenticia, por sus variables aplicaciones. El estudio de los aceites esenciales enfocado en la actividad biológica es de vital importancia ya que estos pueden presentar o no microorganismos patógenos para el ser humano; ya sean estos utilizados para alimentación, bien por la producción de toxinas en caso de estar presentes, por su capacidad para alterar las propiedades organolépticas o también en la conservación misma de los alimentos (Rosales, 2014).

Gracias a la variabilidad en la composición química de los aceites esenciales encontramos una gran multifuncionalidad como consecuencia de la capacidad para interactuar con receptores específicos de múltiples dianas biológicas, razón por la cual los aceites esenciales se destacan por ser eficientes insecticidas frente un gran número de insectos, poseen también actividad antimicrobiana y fitotóxica (Santana et al, 2012).

En el presente estudio se evaluará la capacidad biológica frente a una diversa gama de bacterias patógenas perjudiciales para el ser humano; entre las cuales mencionamos bacterias Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*; bacterias Gram-positivas: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*.

1.3.1. Bacteria.

Las bacterias son organismos unicelulares de tamaño reducido y de estructura muy sencilla, denominados seres procariotas. Estructuralmente están constituidos por: elementos obligados que se encuentran presentes en todas las bacterias y son vitales para su supervivencia. Y por elementos facultativos: los mismos que pueden o no estar presentes en las bacterias (Granados & Villaverde, 2003).

Son organismos procariotas que carecen de membrana nuclear, mitocondria, aparato de Golgi y retículo endoplasmático, se reproducen por división asexual. Existen algunas bacterias que carecen de pared celular, pero tienen la capacidad de sobrevivir en el interior de las células

huésped. Su tamaño oscila entre 1 a 20 μm , poseen diversas formas como esféricas, bastoncillos o espirales y pueden presentarse como células aisladas, en cadenas o formando cúmulos (Murray et al , 2009).

Las bacterias se clasifican en dos grupos según la estructura de su pared celular. En la fig. 2 se observa la estructura de las bacterias grampositivas que poseen una pared celular que está constituida por una capa gruesa de peptidoglucano y otra gramnegativa que posee una capa fina de peptidoglucano, así también como una membrana externa (Prats G. , 2006).

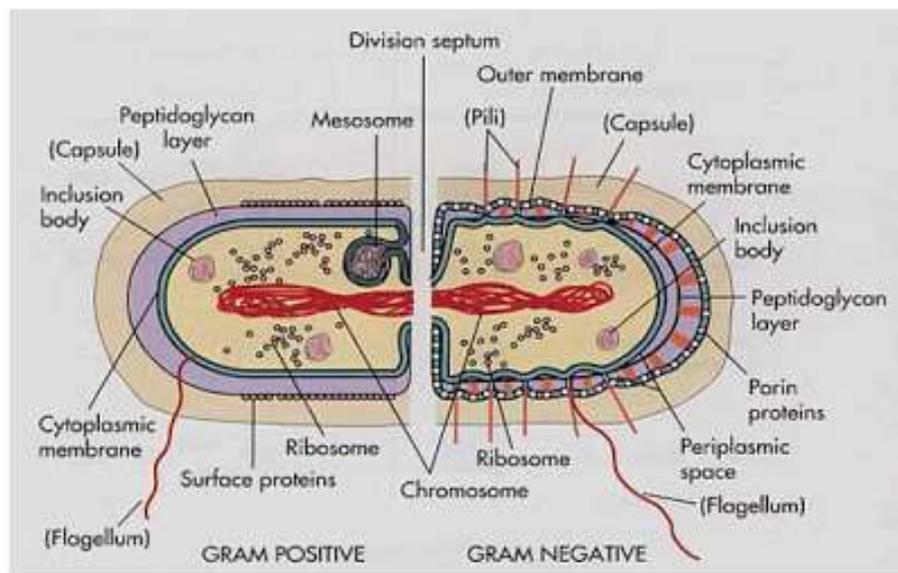


Figura 2. Estructura de las bacterias Gram positivas y Gram negativas
Fuente y Elaboración: (Aca et al , 2010).

1.3.2. Bacterias Gram-Negativas.

Las bacterias gramnegativas poseen una pared celular compleja que consta de una membrana exterior y una membrana media. La membrana exterior está compuesta por polisacáridos, lipoproteínas y fosfolípidos. Los fosfolípidos están insertados en una bicapa, con la parte hidrofóbica hacia dentro y la parte hidrofílica fuera. Los polisacáridos y la lipoproteínas se encuentran insertadas en la capa fosfolipídica; esta membrana funciona como un mecanismo de barrera. La membrana media está compuesta por una capa delgada de peptidoglucano que contienen muchos tipos de proteínas, enzimas y toxinas (Bibek & Arun, 2010).

1.3.2.1. *Escherichia coli*.

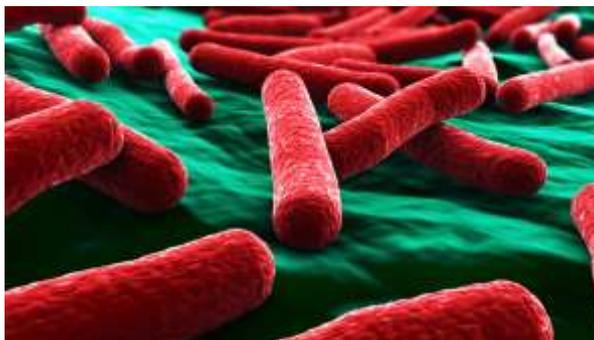


Figura 3. *E. coli*

Fuente y Elaboración: (Tortora, Funke, & Case, 2007)

Escherichia coli es un bacilo anaerobio facultativo, inmóvil, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, tribu Escherichia, la mayor parte de ellas fermentan lactosa, y así mismo son capaces de producir indol a partir de triptófano (Puerta & Mateos, 2010).

Se considera como flora normal, sin embargo en algunas ocasiones éstas llegan a invadir de una forma exagerada el intestino, provocando graves problemas de salud, principalmente diarreas. Existen seis grupos de *E. coli* productora de diarrea: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC) (Rodríguez, 2002).

1.3.3. Bacterias Gram- Positivas.

Las bacterias grampositivas están formadas por una membrana plasmática y una pared celular compuesta por una capa gruesa de peptidoglucano. La pared celular se une a la membrana citoplasmática gracias a las moléculas del ácido lipoteicoico. La capa de peptidoglucano otorga una resistencia grande a este grupo de bacterias (Forero & Sánchez, 2008).

En este grupo de bacterias se incluyen tanto a especies móviles como inmóviles, pueden presentar forma de bacilos o cocos, con paredes celulares gruesas o sin ellas. Algunas de estas especies son fotosintéticas, pero en su gran mayoría son heterótrofas (Rincón et al, 2014).

1.3.3.1. *Staphylococcus aureus*.

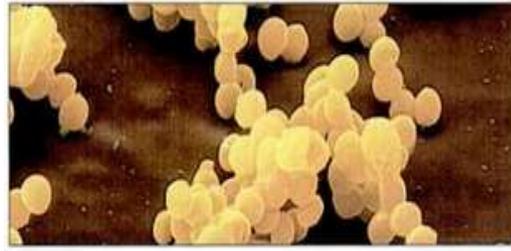


Figura 4. *S. aureus*

Fuente y Elaboración: (Tortora, Funke, & Case, 2007)

S. aureus pertenece a un gran grupo denominados con el mismo nombre, se caracterizan por ser inmóviles, no formadoras de esporas, por lo general no poseen cápsula. Productora de catalasa, una enzima que permite desdoblar el peróxido de hidrogeno, y principalmente se diferencia de otras especies ya que este microorganismo sintetiza la enzima coagulasa, la misma que tiene la función de coagular el plasma (Pahissa, 2009).

Desde tiempo atrás el *S. aureus* ha sido considerado como peligrosa y de mucho cuidado en la salud de las personas ya que este es causante de muchas infecciones como neumonía; que como consecuencia se le atribuye un alto crecimiento de mortalidad y morbilidad (Franklin & Lowy, 1998).

1.3.3.2. *Micrococcus luteus*.



Figura 5. *M.luteus*

Fuente y Elaboración: (Tortora, Funke, & Case, 2007)

Se caracteriza por ser un aerobio estricto formador de colonias que miden aproximadamente de 1 a 2 mm de diámetro, presentan un aspecto mate o amarillo específicamente el microorganismo mencionado con anterioridad, poseen una forma convexa con bordes enteros (Usó, Gil, & Gomila, 2003).

1.3.3.3. *Enterococcus faecalis*.

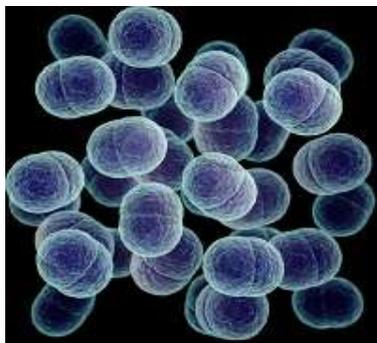


Figura 6. *E. faecalis*

Fuente y Elaboración: (Tortora, Funke, & Case, 2007)

Enterococcus faecalis de forma esférica u ovoide, su tamaño oscila entre 0,6-2,0 x 0,6-2,5 μm , anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, con metabolismo fermentativo. Crecen óptimamente a temperaturas de 37°C (Díaz, Rodríguez, & Zhurbenko, 2010).

Se le ha otorgado ser la causante de una gran variedad de infecciones nosocomiales como podemos recalcar la infección de vías urinarias entre la más común (Andrew et al, 2004).

1.3.4. Hongos.

Los hongos pueden ser unicelulares o pluricelulares. Los unicelulares están formados por células aisladas redondas u ovaladas, denominadas levaduras. Los pluricelulares están constituidos por células alargadas. El aspecto de sus colonias suelen presentarse como algodonosas, lanosas, pulverulentas, ceras, vellosa, aterciopelada; los micelos blanco, violeta intenso, amarillo, verde azulado o rojo vinoso (Prats G. , 2005).

Son unidades anatómicas y de crecimiento: la hifa, en hongos como se muestra en la figura 7, y la levadura en hongos unicelulares figura 8. Las hifas son estructuras cilíndricas o tabicadas, crecen por el ápice y crecen en cualquier dirección figura 9; un conjunto de hifas se denominan micelio y cuando alcanzan un tamaño adecuado se dice que forman colonias como lo muestra la figura 10. Las levaduras presentan formas diversas mencionadas en el apartado anterior y se reproducen asexualmente por gemación, fisión binaria o fragmentación (Uribarren & Bazán, 2017).

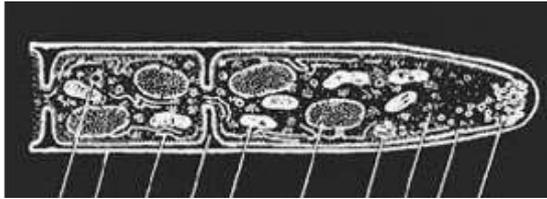


Figura 7. Estructura de hifa
Fuente y Elaboración: (Uribarren & Bazán, 2017)

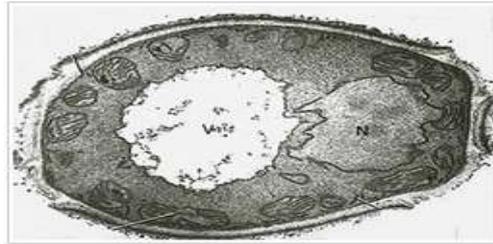


Figura 8. Estructura de la levadura
Fuente y Elaboración: (Uribarren & Bazán, 2017)

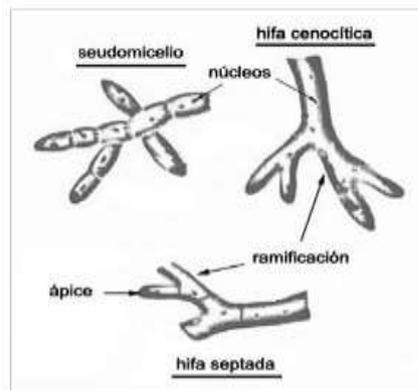


Figura 9. Tipos de hifa
Fuente y Elaboración: (Uribarren & Bazán, 2017)

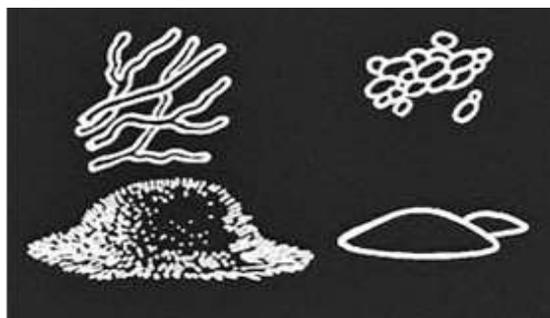


Figura 10. Colonias filamentosas y levaduriformes
Fuente y Elaboración: (Uribarren & Bazán, 2017)

1.3.4.1. *Candida albicans*.

C. albicans es un microorganismo eucarionte perteneciente al reino Fungi (Ucar, Rojas, & Ballester, 2007). Es una levadura comensal que reside en las membranas de las mucosas oral, vaginal y gastrointestinal; posee características intrínsecas que promueven la causa de patogenicidad, entre sus factores de virulencia se incluyen adhesinas, el paso morfológico de la fase levaduriforme a la fase filamentosa, la secreción de enzimas como proteasas y fosfolipasas (Panizo & Reviakina, 2001).

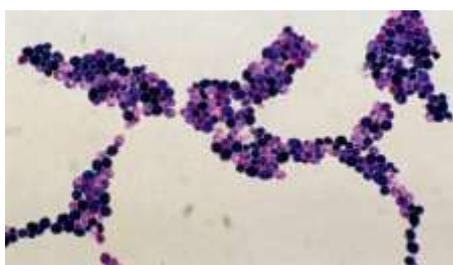


Figura 11. *Candida albicans*
Fuente y Elaboración: (Ucar, Rojas, & Ballester, 2007)

1.4. Actividad antioxidante.

Un antioxidante es una molécula con la capacidad de prevenir la oxidación de un sustrato, ya que actúa como donador de electrones. Todos los seres vivos utilizan oxígeno para generar energía, lo cual libera radicales libres que no son compatibles con la vida a menos que existan mecanismos de defensa que los neutralice, los mismo que se los conoce como antioxidantes. Existen dos tipos de antioxidantes: los endógenos que son fabricados por la misma célula y los exógenos que ingresan al organismo a través de factores externos como en la dieta (Ciappini et al, 2013).

Entre las principales propiedades antioxidantes de las plantas aromáticas cabe destacar la capacidad de regular las alteraciones relacionadas con el estrés oxidativo inducido por las especies reactivas de oxígeno y radicales libres. Los aceites esenciales obtenidos de plantas aromáticas o medicinales contienen principios activos que exhiben bioactividades como la antioxidante, motivo por el cual hoy en día se ha mostrado un gran interés por el consumo de fuentes enriquecidas con las moléculas antes mencionadas (León et al, 2015).

Los aceites esenciales están formados por varios antioxidantes entre los que podemos mencionar: derivados de ácidos fenólicos, flavonoides, terpenos, tocoferoles, fosfolípidos y

ácidos orgánicos polifuncionales; atribuyendo a la disminución de enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y cáncer (Torrenegra, 2014).

Para la determinación de la actividad antioxidante de los aceites esenciales utilizamos los siguientes métodos: ABTS (2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo o DPPH) (Castro J. , 2008).

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

En este ensayo se genera el radical ABTS (2,2-azinobis; ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) producido por el radical ferrilmoglobina, el mismo que es generado a partir de mioglobina y H₂O, resultando un cromóforo azul-verde de ABTS. Este método se caracteriza por ser utilizado para medir la capacidad antioxidante de compuestos coloreados, y presentar una absorbancia próxima a la región infrarroja (734nm), midiendo el rango de punto final contra un punto de tiempo fijo o transcurrido, reduciendo así, las posibilidades de interferencias de compuestos colorados que absorben en la región visible o de compuestos resultantes de reacciones secundarias (Zaporozhets et al, 2004).

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

La molécula 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) es un radical libre estable gracias a la deslocalización en un electrón, por lo cual no se dimeriza como la mayoría de los radicales. La deslocalización del electrón intensifica el color violeta típico del radical, el mismo que absorbe en metanol a 517 nm. Puede existir una reacción entre el sustrato antioxidante y la solución de DPPH, cuando ésta se da existe la donación de un átomo de hidrogeno lo que provoca el desvanecimiento del color, cambio que es monitoreado espectrofotométricamente y utilizado para la determinación total de los parámetros para las propiedades antioxidantes (Poma et al, 2015).

1.5. Plantas medicinales

Se definen como vegetales elaboradores de productos denominados principios activos , que son sustancias que poseen una acción farmacológica, sea ésta beneficiosa o no, sobre los organismos vivos. Se utiliza principalmente como drogas o medicamentos para aliviar dolores o mejorar la salud de las personas. Las plantas medicinales están compuestas principalmente por taninos, vitaminas y sustancias antibióticas (Muñoz F. , 2002).

La medicina tradicional se ha convertido en una parte muy importante cuando se habla del restablecimiento de la salud. En algunos países, la medicina tradicional se la denomina como medicina complementaria; la misma que es utilizada para prevenir y tratar enfermedades, especialmente crónicas; gracias a los metabolitos o compuestos químicos con acción farmacológica que poseen las plantas medicinales y aromáticas (Nogales, 2004).

El uso de la medicina alternativa hoy en día está muy extendido, ya no se lo considera solamente patrimonio de sociedades con cultura tradicional sino también se ha visto ampliamente aplicada en países desarrollados, de tal manera que según investigaciones se indica que, un 46% de los australianos, así como 49% de franceses y 70 % de canadienses han utilizado alguna de estas terapias (Peña, 2007).

La medicina alternativa conforma un sistema médico y de terapias relacionadas, reconocido en muchos países del mundo, conocido en varios ámbitos como por las autoridades, personal de salud público, los practicantes de ella, que son los usuarios, ya que constituye una opción para la atención de sus necesidades (Rincón J. , 2006).

La OMS ha desarrollado estrategias con respecto a la medicina tradicional, la que consideran que podría efectuar en pro de la salud, la que concierne la integración de ella en los sistemas de salud de los países. Se puede aplicar como atención primaria de la salud de la población, aludiendo así a que el costo sería accesible y bajo en comparación a tratamientos químicos, lo cual determinaría una recuperación rápida, natural y económicamente bajo (OMS, 2013).

1.6. Flora Ecuatoriana

El Ecuador es catalogado como uno de los países que poseen una gran biodiversidad en todo el mundo. Hace una década atrás investigadores caracterizaron los tipos de vegetación que existen en el país, identificando así 71 formaciones botánicas distribuidas en tres regiones: 29 en la Costa, 31 en la Sierra y 11 en el Oriente (Balslev et al, 2008).

En el Ecuador están registradas 18766 especies de plantas vasculares, de las cuales 5172 poseen usos que han sido reportados; es decir que una de cada tres especies es útil para la gente. De estas 595 son especies exóticas. Así mismo se ha documentado 15.306 especies nativas de las cuales son endémicas 4173 (Vacas et al, 2015).

Gracias a que el Ecuador está situado en la línea ecuatorial, a una latitud cero, posee una gran riqueza cultural, natural y arqueológica, así mismo su gran biodiversidad geográfica, biológica y étnica, donde convergen los Andes, Amazonia y la cuenca del pacífico (Coloma & Ron, 2001).

Es difícil establecer la relación exacta entre la altitud y temperatura, pero se puede considerar una división ecológica altitudinal tomando en cuenta otros factores, en especial la distribución de la flora ya que esta está ligada a las condiciones de temperatura y suelo (Patzelt, 2010).

El herbario nacional de Ecuador se compone de 237000 pliegos de herbario de plantas vasculares, no vasculares, hongos y líquenes provenientes de cuatro regiones de nuestro país: Costa, Sierra, Amazonia, Galápagos (Fernández et al, 2015).

Según Orgensen & León, 1999 las especies ecuatorianas están distribuidas en cada región, teniendo en mayor proporción la región andina, con aproximadamente 9.865 especies que en porcentaje representa el 64,4%. La región de la Costa representa 4.463 o el 29,2% ; mientras que en la región Amazónica contamos con 4.857 especies o el 31,7%. La región que representa el número más bajo de especies es Galápagos con 699 o el 4,6%.

1.6.1. Flora aromática de Ecuador.

En Ecuador existen alrededor de 500 especies que pertenecen a 288 familias, las que son utilizadas por comunidades con cultura o conocimiento ancestral aplicadas con fines medicinales; de estas 125 son las más comercializadas. Nuestro país es considerado como el más megadiverso, el mismo que cuenta con un 75% de especies nativas, mientras que el 11% han sido introducidas especialmente por españoles (Gallardo, 2011).

El sector de plantas medicinales y aromáticas en el Ecuador ha presentado un desarrollo grande que ofrece posibilidades de ser utilizados para importantes productos de exportación, siendo sus principales mercados el farmacéutico, alimenticio y cosmético. La producción de hierbas aromáticas y medicinales está presente en todas las regiones del país gracias a ello es que cada especie cuenta con características propias y culturales de cada zona (Almeida, 2011).

1.7. La familia *Zingiberaceae*.

Son plantas herbáceas perennes, rizomatosas, aromáticas; sus hojas son dísticas o dispuestas en espiral sobre el tallo, sésiles o pecioladas, con vainas foliares abiertas o cerradas, posee lígulas, laminas lanceoladas, obovadas, pueden ser anchas o angostamente elípticas o lineares, con un nervio prominente y por lo general numerosas venas laterales ascendentes, paralelas entre sí; estrobiláceas, espigadas, racemosas o paniculadas, situadas en los ápices de tallos foliosos o sobre escapos que salen desde la base de la planta, flores bracteadas, una o varias por bráctea, las brácteas a menudo imbricadas, flores hermafroditas, zigomorfas, con frecuencia grandes y vistosas; cáliz tubular trilobado, comúnmente con hendidura a un lado, coroa tubular trilobada ; posee seis estambres, aunque algunas veces ausentes, de los cuales sólo uno es fértil, son de estructura petaliforme, llamada labelo, antera introsa, bilocular; ovario ínfero normalmente trilocular y de plantación axilar; fruto en forma de capsula, con el exocarpio a menudo carnoso; semillas ariladas, pocas numerosas de forma variable (Vovides, 1993).

La familia *Zingiberaceae*, es la más grande del orden Zingiberales, que comprende en aproximadamente 50 géneros y 1000 especies. El estudio taxonómico de la familia es complejo debido a sus flores efímeras y por ende su clasificación aún no es concreta. Varias plantas pertenecientes a la familia mencionada contienen aceites aromáticos. Estos son de importancia económica, como la raíz de *Zingiber Officinale*, que sirve como saborizante de vinos y cervezas. Otras se usan en la industria de la perfumería, medicinal u ornamental (Maas & Maas, 2003).

Los miembros de la familia *Zingiberaceae* poseen un rizoma ramificado y compuestos de segmentos distintos, son de diversos colores que van desde amarillo pálido, amarillo profundo, azul verdoso, rosa o combinaciones de estos en diferentes especies. Los géneros más importantes que son miembros de esta familia son: *Alpinina*, *Amomum*, *Cúrcuma*, *Elettaria*, *Hedychium*, *Kaempferia* y *Zingiber* (Konickal & Mamiyil, 2013).

Los aceites esenciales contienen almidón, gomas y oleorresina, las distintas variedades de esta familia difieren en la proporción que se encuentra. En general los rizomas y frutos son aromáticos, tónicos y estimulantes. Son de distribución tropical y ecuatorial de todo el mundo y raras en regiones templadas (Novara, 2012).

1.7.1. *Zingiber*.

La diferencia entre todos los géneros radica en las características de las hojas que son sésiles, generalmente miden menos de 2 cm de ancho, inflorescencia un tirso compacto, brácteas anchamente ovadas, de color verde claro. *Zingiber* es un género grande de aproximadamente 100 especies distribuidas a lo largo de Asia tropical (Vovides, 1993).

Crece en todas las regiones tropicales del mundo. Las variedades más caras y las de mayor calidad proceden de Australia, India y Jamaica, mientras que las más comercializadas se cultivan en China y Perú (Inca, 2012).

Su nombre proviene del antiguo y casi desaparecido idioma indoeuropeo shringavera que significa cuerpo de cuerno (Acuña & Torres, 2010).

Las especies en enfermedades musculares, reumáticas, coronarias, artritis, úlceras estomacales, reduce el crecimiento de las plantas de *Zingiber* son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional de tumores, reduce la migraña; también para combatir la tos, diarrea y fiebre (Alvear, 2014).

1.7.1.1. *Zingiber officinale*.

Originario del sudeste asiático, se cultiva desde hace aproximadamente 3000 años, el nombre original “sringavera” es un vocablo que significa en forma de cuerno (Salgado, 2011).

Es una planta cuyo tallo subterráneo es un rizoma horizontal. La planta puede llegar a medir hasta 1,8 m de altura, los tallos son rojizos con aspecto de hoja; posee largas hojas alternas, sésiles, lanceoladas y muy agudas en el ápice de aproximadamente 20 cm (Inca, 2012).

Es una especie diploide y que se destaca por su importancia medicinal, se la utiliza como aromática y condimentaría en muchos lugares del mundo. Actualmente es la especie más utilizada en la cultura tradicional de la medicina gracias a los constituyentes químicos que posee, lo que le otorga las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antieméticas y anticancerígenas (Zambrano, 2015).

1.7.1.2. Taxonomía de la especie *Zingiber officinale*.

Tabla 1. Orden taxonómico de la especie de *Zingiber officinale*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Zingiberales
Familia	Zingiberaceae
Subfamilia	Zingiberoideae
Tribu	Zingibereae
Género	Zingiber
Especie	Zingiber officinale

Fuente y Elaboración: (Fonnegra & Jiménez, 2007)

CAPITULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestras

Se utilizaron tres muestras de aceite esencial de *Zingiber officinale*.

2.2. Determinación de las propiedades físicas.

Se determinó la densidad relativa, índice de refracción y actividad óptica del aceite esencial de *Zingiber officinale*.

2.2.1. Densidad relativa.

La densidad relativa se la determinó según la norma AFNOR NF T75-111 (ISO 279:1998) (Ver Anexo I), en donde se utilizó un picnómetro de 1ml, un termómetro y una balanza analítica (Ortuño F, 2006).

Para determinar la densidad relativa del aceite esencial de *Zingiber officinale*, se realizaron tres repeticiones, obteniendo una densidad promedio de cada una de las muestras, calculando así la media, desviación estándar y coeficiente de variación.

2.2.2. Índice de refracción.

La determinación del índice de refracción se lo realizó según la norma AFNOR NF75-112 25 (ISO 280:1998) (Ver Anexo II) en donde se utilizó un refractómetro ABBE, el cual es un dispositivo electrónico que mide la velocidad de propagación de luz en el aceite esencial a una temperatura determinada que oscila en 20 °C.

Para ello se colocó una gota de la muestra de aceite esencial sobre el diafragma del refractómetro y se procedió a la lectura. Obteniendo así un valor medio de las muestras tratadas.

2.2.3. Actividad óptica.

La medición de la actividad óptica se la realizó mediante un polarímetro digital modelo Mrc-Automatic Polarimeter P810 y una celda de 1dm de longitud, el cual midió la capacidad para desviar la luz polarizada del aceite esencial de la muestra.

Se obtuvo un valor promedio a partir de las muestras analizadas, en el anexo III podemos encontrar la fórmula para determinar la actividad óptica.

2.3. Determinación de la composición química del aceite esencial.

2.3.1. Cromatografía de gases.

Para proceder a la identificación química de los componentes que poseen el aceite esencial de la especie *Zingiber officinale* se utilizó la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas CG-EM y al detector de Ionización de Llama CG-ID, las corridas se realizaron en dos columnas una no polar DB-5MS (5%-Fenil-metilpolidiloxano) y una polar HP-INNOWAX (Polietilen Glicol), obteniendo resultados cualitativos y cuantitativos.

2.3.1.1. Preparación de la muestra.

Cada una de las muestras del aceite esencial se preparó en un vial de cromatografía debidamente etiquetado en el cual se colocó 990 uL de diclorometano y 10 uL de la muestra, obteniéndose una concentración al 1% del aceite esencial.

2.3.1.2. Análisis del aceite esencial por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y al detector de ionización de llama.

La identificación de los componentes químicos del aceite esencial de *Zingiber officinale* se realizó mediante un cromatógrafo de gases Agilent y la obtención de espectros de cada compuesto individual. La corrida se realizó con una mezcla de hidrocarburos C₁₀ a C₂₅, conocidos en el mercado como TPH-6RPM de CHEM SERVICE.

El equipo utilizado para realizar el análisis fue un Cromatógrafo de Gases Agilent serie 6890N, acoplado a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973Inert; el equipo cuenta con un inyector automático Split/splitless serie 7683 y un detector de ionización de llama FID provisto de un generador de hidrogeno Gas 9150 Packard.

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

La corrida cromatográfica se realizó con una mezcla de hidrocarburos C₁₀ a C₂₅. Las condiciones utilizadas para realizar correctamente la cromatografía se describen en la figura 12.

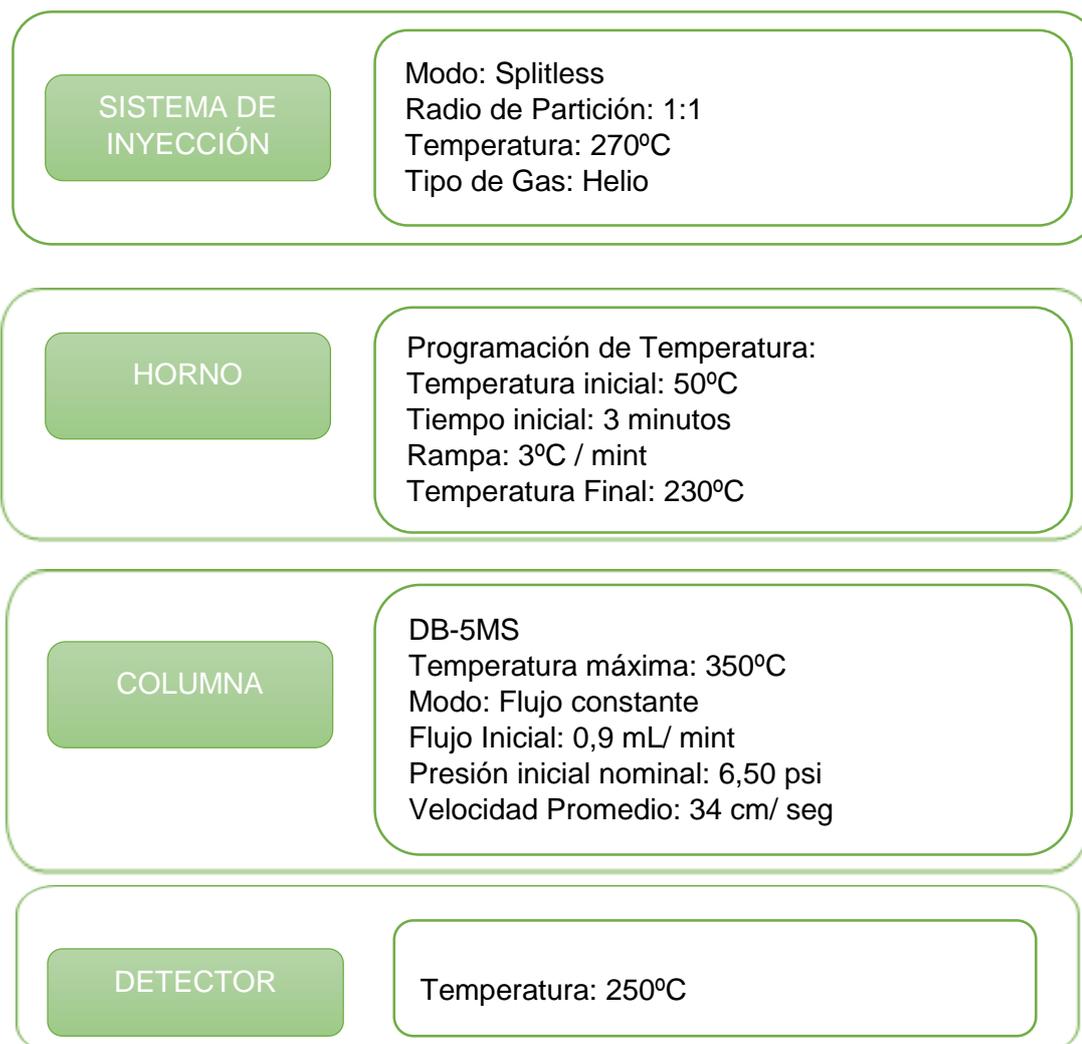


Figura 12. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna no polar DB-5MS

Fuente y Elaboración: La autora.

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

Las corridas cromatográficas se las realizó al igual que en la columna anterior con la inyección de los hidrocarburos. Las condiciones utilizadas se las especifica en la figura 13.

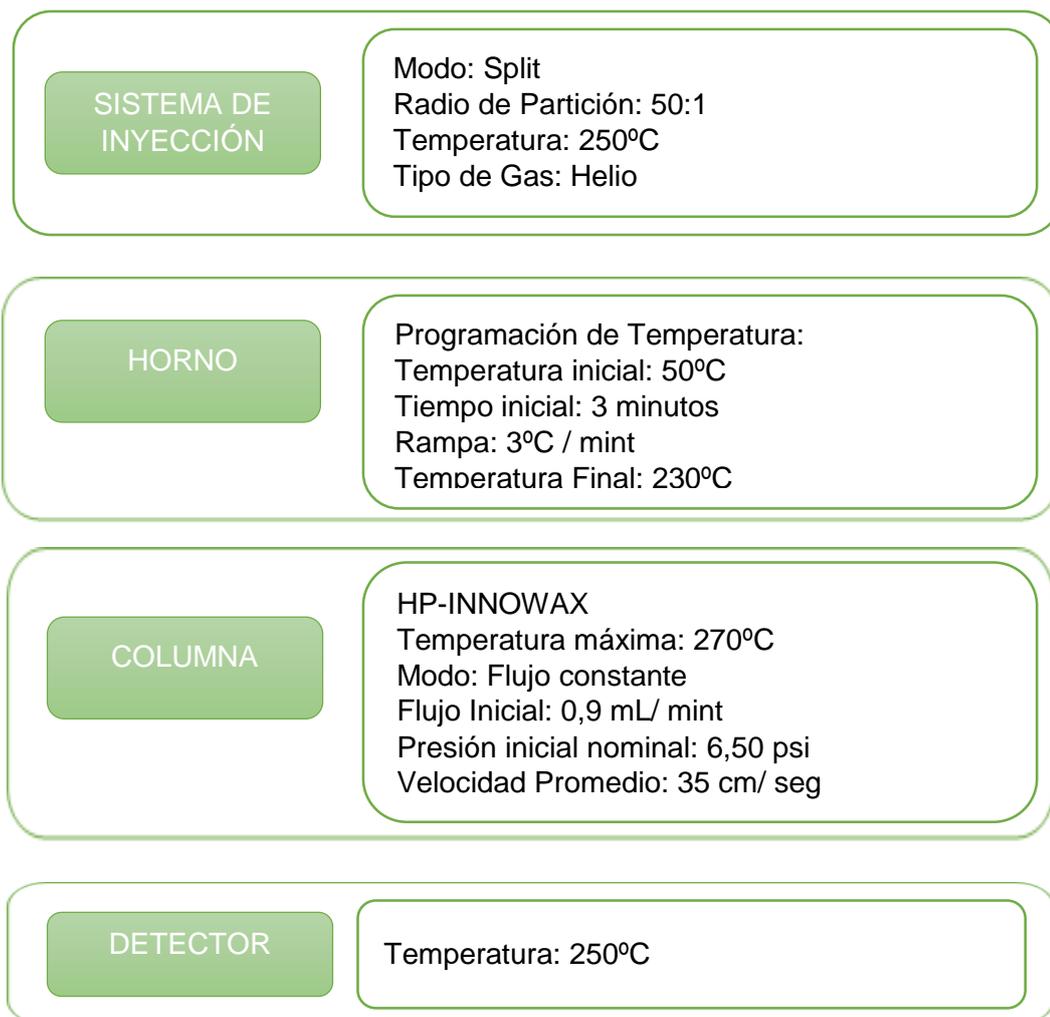


Figura 13. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en columna polar HP-INNOWAX acoplado a espectrometría de masas.

Fuente y Elaboración: La autora

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

El detector de ionización de llama (CG-FID) es uno de los detectores más utilizados en la cromatografía de gases, apropiado específicamente para medidas cuantitativas.

Al igual que en las columnas anteriores se inyectó el aceite esencial de *Zingiber officinale* y los hidrocarburos. Las condiciones de operación se especifican en la figura 14.

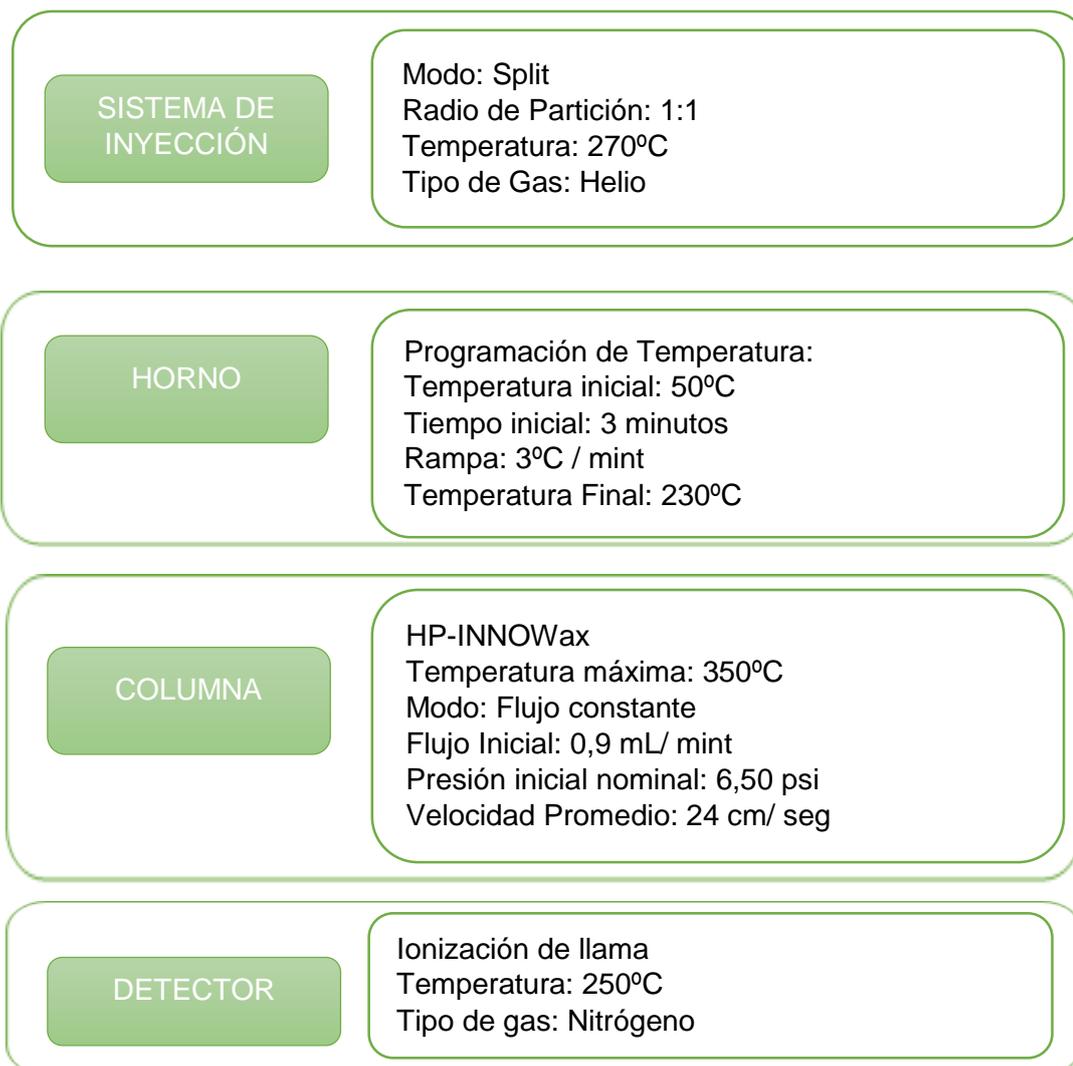


Figura 14. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en columna no polar DB-5MS, acoplada al detector de ionización en llama (FID).
Fuente y Elaboración: La autora

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

De la misma forma que se menciona en el apartado anterior, se inyectaron los hidrocarburos de C₁₀ a C₂₅ y las muestras del aceite de *Zingiber officinale*.

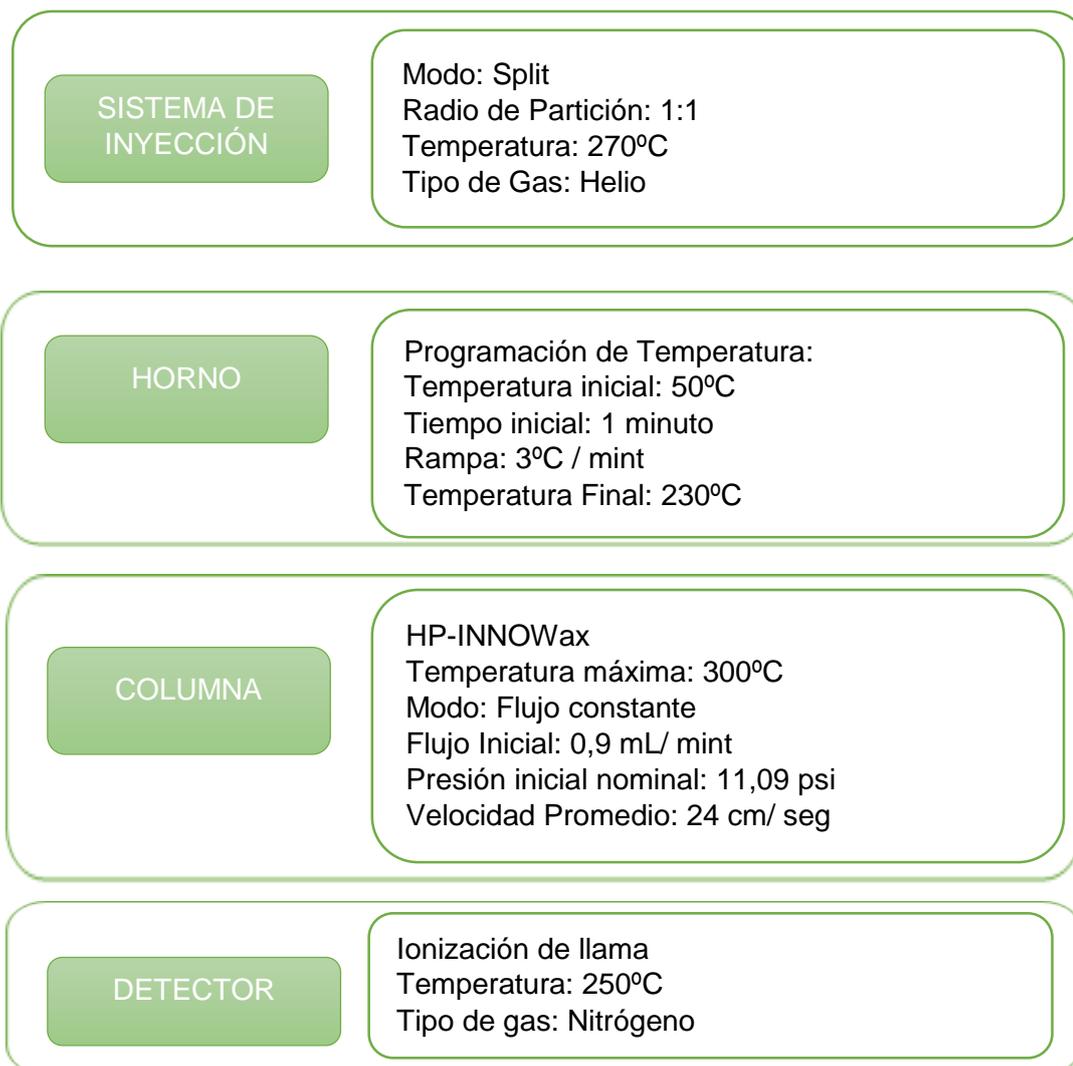


Figura 15. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en columna polar HP-INNOWAX acoplada al detector de ionización en llama (FID).
Fuente y Elaboración: La autora

2.3.2. Identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos químicos del aceite esencial de *Zingiber officinale*, tanto en la columna polar como en la columna no polar.

En cada corrida cromatográfica se puede visualizar los compuestos mediante un cromatograma que se define como el registro de la señal de detección en función del tiempo de elución o de volumen (Sánchez, 2007). La identificación cualitativa se realiza a partir de la posición de los distintos picos con respecto al eje del tiempo, mientras que en la identificación cuantitativa se toma en cuenta el área de cada uno, la cual es proporcional a la concentración del compuesto.

Para que la identificación sea más precisa y confiable se procedió a integrar los compuestos químicos mediante un sistema de integración que es propio del equipo empleado y así proceder a trabajar con los picos ya integrados.

La identificación de los compuestos químicos presentes en el aceite en mención se realiza en base a la comparación de los tiempos de retención con patrones específicos, utilizando el índice de Kovats, así también como el análisis de los espectros de masas de cada pico.

Los índices de Kovats (IK) se calcularon mediante la comparación del tiempo de retención de los hidrocarburos frente al tiempo de retención de los compuestos, aplicando la ecuación 1:

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

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

Una vez calculados los índices de Kovats (IK) tanto de la columna polar como de la columna no polar, se compararon los valores calculados con los valores reportados por (Adams, 2009), bases de datos electrónicas como Nist (National Institute of Standards and Technology), de tal manera que la diferencia que exista entre estos dos parámetros sea menor o igual a 20 unidades, teniendo como límite permitido de diferencia menor a 50 unidades; así mismo también consideramos el número de CAS que presenta cada compuesto facilitando de esta forma la búsqueda e identificación de los constituyentes de *Z. officinale*.

Utilizamos también la información de los espectros de masa de cada compuesto ya que esta proporciona datos estructurales de la molécula analizada, los espectros son analizados por la base de datos del equipo, para de esta manera comparar con la biblioteca electrónica Wiley 7n.1., seleccionando así los que tienen un grado de correspondencia mayor al 90%.

2.4. Determinación de la actividad biológica del aceite esencial de *Z. officinale*.

Para analizar la actividad biológica del aceite de *Zingiber officinale* determinamos la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en 7 cepas bacterianas ATCC (American Type Culture Collection), por el método de microdilución en caldo usando una concentración final de 5×10^5 ufc/ML.

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se define como la concentración más baja de sustancia que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de haber sido incubado a un tiempo determinado por lo general 24 horas a 37°C (Horna, Silva, Vicente, & Tamariz, 2005).

2.4.1. Actividad antimicrobiana.

Para evaluar la actividad antimicrobiana del aceite de *Zingiber officinale* se utilizaron dos grupos de cepas bacterianas clasificadas en Bacterias Gram-positivas y Bacterias Gram-negativas, para de esta manera determinar de esta manera si la muestra se lo puede utilizar como antibacteriano. En la tabla 2 se mencionan los microorganismos empleados.

Tabla 2. Cepas Bacterianas utilizadas

Cepas Bacterianas	
Bacterias Gram-negativas	Bacterias Gram-Positivas
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341

Fuente y Elaboración: American Type Culture Collection

2.4.1.1. Método microdilución en caldo.

La prueba se realiza en una placa que contiene 96 pocillos, en los cuales se realiza diluciones seriadas, cada pocillo debe contener 0,1 mL de caldo (Malbrán, 2012).

La ventaja de este método radica en un aumento de la sensibilidad sobre volúmenes pequeños, lo que permite diferenciar entre un efecto bactericida y bacteriostático (Ramírez & Marín, 2009)

2.4.1.2. Preparación de la muestra.

Se preparó una solución del aceite esencial en DMSO (dimetil-sulfóxido), tomando 100 uL de aceite esencial de *Z. officinale*, y 400 uL de DMSO.

2.4.1.3. Preparación del cultivo bacteriano “Cultivo Overnight”.

Primeramente se prepararon los caldos de cultivos específicos para cada cepa bacteriana. Para la siembra se utilizó 30 uL de cada cepa bacteriana, las mismas que se encontraban almacenadas en una reserva criogénica a -80°C. Una vez realizada la siembra se incuban los medios por 14 -16 horas a 37°C. En la tabla 3 se muestran las condiciones y medios necesarios para el crecimiento bacteriano.

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

Bacterias	Medio de Cultivo	Condiciones de Incubación
<i>Escherichia coli</i>	Caldo Mueller Hinton	Temperatura: 37°C Tiempo: 14-16 horas
<i>Micrococcus luteus</i>	Caldo Manitol Salado	Temperatura: 37°C Tiempo: 14-16 horas
<i>Enterococcus faecalis</i>	Caldo Infusión Cerebro-Corazón	Temperatura: 37°C Tiempo: 14-16 horas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo Trypticasa Soya	Temperatura: 37°C Tiempo: 14-16 horas

Fuente y Elaboración: American Type Culture Collection

2.4.1.3.1. Inoculación.

Una vez incubado el cultivo, transferimos 150-300 uL a un tubo que contenía 7 mL de suero fisiológico estéril ajustando el inóculo a una concentración equivalente a 0,5 en la escala de Mc.Farland.

De la suspensión preparada anteriormente, se tomó 140 uL 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 transfirió 100 uL a la placa de cultivo para completar un volumen final de 200 uL, obteniendo así una concentración bacteriana final de 5×10^5 ufc/mL en cada pocillo.

2.4.1.3.2. Procedimiento.

El análisis se llevó a cabo en una cabina de seguridad, debidamente esterilizada garantizando de esta manera que se encuentre libre de contaminaciones. El ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos aplicando el procedimiento de dilución doble seriada: primeramente del caldo Mueller Hinton se transfirió 180 uL a cada uno de los pocillos de la fila, y 100 uL en

los pocillos siguientes, después se agregó 20 uL de la solución del aceite diluido a los pocillos de la primera fila, con excepción de los tres últimos pocillos, los cuales contendrán: control de esterilidad (200 uL de caldo Mueller Hinton), control negativo (180 uL Mueller Hinton + 20 uL DMSO), control positivo (180 uL caldo Mueller Hinton + 20 uL de Tetraciclina de 1,953 ug/mL para los microorganismo utilizados a excepción de *Enterococcus faecalis* en dónde se empleó Tetraciclina 15,625 ug/mL, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus vulgaris* se utilizó Tetraciclina de 3,906 ug/mL respectivamente. Se mezcló el medio con el aceite y se procedió a realizar soluciones seriadas, pipeteando de 15 a 20 veces la solución del primer pocillo de donde se tomó 100 uL y se diluyó con 100 uL del siguiente pocillo, así hasta obtener 8 diluciones consecutivas; llegando a una concentración final de la solución de medio y aceite contenida en cada uno de los pocillos de 1000 ug/mL a 7,81 ug/mL. Para el control de esterilidad, control negativo y control positivo se aplicó el mismo procedimiento.

Una vez preparada la placa de microdilución se inoculó con 100 uL de la suspensión del inóculo bacteriano en todos los pocillos, con excepción de los pocillos que contienen los controles negativo, positivo y de esterilidad; completando un volumen final de 200 uL, ajustando la población bacteriana a 5×10^5 ufc/mL. Las placas se sellaron e incubaron a 37°C por 24 horas para su posterior lectura.

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

Se retiró las placas de microdilución de la incubadora y se observó cuidadosamente cada caja utilizando luz reflejada; primeramente se examina el control de esterilidad para descartar si existió alguna contaminación cuando se practicaba el ensayo, ya que si existiera alguna irregularidad, la prueba se debe repetir.

En el control positivo se analiza el crecimiento adecuado de las bacterias en la placa de microdilución, el cual se refleja como una turbidez o un pellet de > 2 mm.

Finalmente en el control negativo no se debe observar crecimiento alguno, esta debe presentar un aspecto claro y sin turbidez. Para determinar en qué punto se encuentra la concentración mínima inhibitoria de la muestra, es decir la concentración más baja en la que puede actuar el aceite como antimicrobiano, se debe leer el pocillo donde se distinga turbidez en el medio.

2.4.2. Actividad antifúngica.

Al igual que en la actividad antibacteriana se determinó la actividad antifúngica frente a *Candida albicans*, mediante la Concentración Mínima Inhibitoria aplicando el método de dilución en caldo.

2.4.2.1. Método de Microdilución en caldo.

Se aplica el mismo método descrito en la actividad antibacteriana, numeral 2.1.3.1.1

2.4.2.2. Preparación de la muestra.

Al igual que en lo descrito en las pruebas antibacterianas en el numeral 2.1.3.1.2. se preparó una solución de aceite diluido, tomando 980 uL de DMSO y 20 uL del aceite esencial de *Zingiber officinale*.

2.4.2.2.1. Preparación de la Suspensión de los Inóculos Fúngicos.

Se preparó la suspensión del hongo de *Candida albicans* (ATCC 26555) a partir de una reserva criogénica a -80°C. Se transfirió una cantidad adecuada del criotubo a un volumen de medio Sabouraud para obtener una concentración de 1×10^5 esporas/mL. A partir de este inóculo se siembran 100 mL/pocillo, la concentración final obtenida fue de 5×10^4 esporas/mL.

2.4.2.2.2. Procedimiento.

Se aplicó el mismo procedimiento de dilución seriada que con las bacterias, cambiando en la concentración final del inóculo, que en hongos es de 5×10^4 esporas/mL. La concentración final del aceite fue de 1000 a 7,81 ug/mL, las diluciones se realizaron hasta obtener 12 diluciones consecutivas, y de la suspensión del inóculo fúngico se tomaron 100 uL, para completar a 200 uL el volumen final de la placa de cultivo. Finalmente se incuban las placas a 28°C monitoreando el crecimiento hasta las 96 horas.

2.5. Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Z. officinale*.

Para determinar la actividad antioxidante del aceite esencial de *Zingiber officinale* se aplicaron dos métodos espectrofotométricos: Capacidad de atrapamiento del catión –radical ABTS+ y Radical DPPH.

Las mediciones se determinaron según la absorbancia leída por el equipo en cada muestra. Para ello se utilizó un espectrofotómetro Genesys 10UV-VIS Scanning 333907. Las longitudes de ondas utilizadas en cada método se estimaron en 734 nm y 515 nm.

2.5.1. Preparación de la muestra.

Para realizar los ensayos se necesitó aplicar diluciones del aceite esencial trabajando con 5mg de este; el cual se procedió a la primera dilución que empezó con una concentración máxima de 1000 ppm; hasta llegar a una concentración mínima final de 5 ppm, ya que la concentración de 0 ppm lleva solamente metanol.

Las muestras se trataron por triplicado, cada dilución con sus volúmenes respectivos son descritos en la tabla 4.

Tabla 4. Volumen utilizado para cada dilución del aceite

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

Fuente: Investigación Experimental
Elaboración: La autora

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

2.5.2.1. Solución patrón y de trabajo de ABTS⁺.

La solución patrón se la preparó mediante la mezcla de dos reactivos específicos. En primer lugar se tomó 0,1015 g del reactivo ABTS⁺ y se aforó con agua destilada en un balón de 25 mL, de la misma forma se preparó el siguiente reactivo, donde se utilizó 0,01757 g de persulfato de potasio (K₂ S₂ O₈). Una vez preparados los reactivos necesarios se los mezcló y dejó reaccionar por 12 horas procurando que no le llegue la luz.

Transcurridas las 12 horas de reacción, se tomó una alícuota de 1mL añadida a 60 mL de metanol, procurando obtener una absorbancia de $1,1 \pm 0,02$ a 734 nm. Si la lectura arrojada por el equipo es menor al resultado esperado debemos añadir más solución de trabajo, y si el resultado es mayor al esperado se añade metanol puro.

2.5.2.2. Estándar Trolox para ABTS⁺.

Para la solución estándar se utilizó Trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico) e hidroxitolueno butilado (BHT), los cuales son patrones de referencia utilizados

para expresar la actividad antioxidante del aceite esencial como Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) que es la capacidad antioxidante equivalente a Trolox.

Se tomó 25 mg de Trolox y se aforó en un balón de 100 mL con metanol y 22mg de BHT el mismo que se aforó en 50 ml de metanol. En la tabla 5 se explica cómo se realizaron cada una de las diluciones.

Tabla 5. Volumen necesario para cada dilución de Trolox y BTH

Volumen necesario para cada dilución	
Concentración	Volumen de cada dilución Trolox y BHT
Concentración 1 (1000 ppm)	500 uL Trolox/BHT
Concentración 2 (800 ppm)	1000 uL MeOH + 400 uL de concentración 1
Concentración 3 (600 ppm)	1250 uL MeOH + 3750 uL de concentración 2
Concentración 4 (450 ppm)	1250 uL MeOH + 3750 uL de concentración 3
Concentración 5 (300 ppm)	1670 uL MeOH + 3330 uL de concentración 4
Concentración 6 (150 ppm)	2500 uL MeOH + 2500 uL de concentración 5

Fuente: Investigación Experimental
Elaboración: La autora

Se utilizó 150 uL de cada dilución y 2850 de la solución de trabajo dejándolo por 2 horas en la oscuridad, transcurrido el tiempo se leyó la absorbancia a 734 nm. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada concentración de Trolox y BHT respectivamente.

2.5.2.3. Lectura de muestras.

Con la ayuda del espectrofotómetro se procedió a la lectura de las muestras, las mismas que se leyeron con una absorbancia de 734 nm. Para ello se debe tener mucha precisión y así poder determinar la actividad antioxidante que posee el aceite esencial de *Zingiber officinale*.

2.5.3 Método radical DPPH.

2.5.3.1. Solución patrón y de trabajo DPPH.

Se pesó 0,024 g de reactivo DPPH y se aforó con metanol a 100 mL, se almacenó a -4°C hasta su uso, luego tomamos 10 mL de esta solución y se adicionó 45 mL de metanol, con el fin de obtener la solución de trabajo; medimos la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm ajustándose hasta obtener una lectura precisa de $1,1 \pm 0,02$.

2.5.3.2. Estándar Trolox y BHT para DPPH.

El método se lo mencionó en el apartado anterior, el estándar es utilizado en los dos métodos para la determinación de la actividad antioxidante del aceite.

2.5.3.3. Lectura de muestras.

Al igual que el método ABTS⁺ se utilizaron varias diluciones a diferentes concentraciones del aceite esencial (ver tabla 4) y las diferentes concentración del estándar Trolox y BHT (ver tabla 5).

Las muestras se trataron por triplicado, y se dejaron reaccionar por 24 horas en la oscuridad, luego de la reacción se procedió a la lectura de las muestras a una absorbancia de 515 nm.

2.5.4. Análisis de los datos obtenidos mediante ABTS⁺ y DPPH.

Calculamos el porcentaje de inhibición (%Inh) mediante las absorbancias determinadas por ambos métodos, la misma que fue evaluada a diferentes concentraciones. Usando la ecuación 2:

$$\% \text{ Distribución} = \left\{ \left(\frac{\text{Abs.blanco} - \text{Abs.muestra}}{\text{Abs.blanco}} \right) * 100 \right\}$$

Donde:

Abs. Blanco= absorbancia de la solución de trabajo

Abs.muestra= absorbancia de la respectiva concentración

Con los valores obtenidos de % de Inh, se calcula el valor de la concentración media inhibitoria (CI₅₀) de la muestra. El CI₅₀ de cada aceite se determinó realizando una gráfica de concentración (ppm) vs. Porcentaje de inhibición (%Inh) obteniendo de esta manera, una ecuación para la curva y calculando luego la concentración para la cual el porcentaje de inhibición es del 50%. Para los dos métodos (ABTS⁺ y DPPH) se usa como solución estándar Trolox, cuya capacidad antioxidante se evalúa en las mismas condiciones de trabajo de las muestras.

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Determinación de las propiedades físicas del aceite esencial de *Z. officinale*

Entre las características físicas determinadas del aceite esencial de *Zingiber officinale* evaluamos: densidad, índice de refracción y actividad óptica.

3.1.1. Densidad.

La densidad del aceite esencial de *Zingiber officinale* se muestra en la tabla 6, obteniendo un promedio de las tres muestras analizadas.

Tabla 6. Densidad relativa del aceite de *Z. officinale*

Muestras	Densidad (g/cm ³)	\bar{X}	σ
ZO1	0,8840	0,8846	0,00109
ZO2	0,8859		
ZO3	0,8840		
ZO1: Primera muestra ZO2: Segunda muestra ZO3: Tercera muestra \bar{X} : Media aritmética correspondiente a las diferentes repeticiones σ : Desviación estándar			

Fuente: Investigación Experimental
Elaboración: La autora

En la tabla 6 se puede observar la densidad promedio de las tres muestras del aceite esencial llegando a un valor de 0,8846.

Según Negrete & Secaira, 2016 el valor promedio de la densidad del aceite de *Z.officinale* oscila entre los rangos 0,890- 0,900 g/ cm³, pudiendo así ser comparable con el valor obtenido en nuestro estudio, se demuestra que el aceite de interés se encuentra dentro de este rango. El resultado obtenido del aceite de *Zingiber officinale* determina la calidad y pureza de nuestra muestra de trabajo.

3.1.2. Índice de refracción.

En la tabla 7 se observan los índices de refracción, los mismos que corresponden a los valores promedios de las tres muestras analizadas.

Tabla 7. Índice de refracción del aceite esencial de *Z. officinale*.

Muestras	Índice de refracción	\bar{X}	σ
ZO1	1,4846	1,4847	0,0006
ZO2	1,4842		
ZO3	1,4855		
ZO1: Primera muestra ZO2: Segunda muestra ZO3: Tercera muestra \bar{X} : Media aritmética correspondiente a las diferentes repeticiones σ : Desviación estándar			

Fuente: Investigación Experimental.

Elaboración: La autora.

El índice de refracción promedio del aceite esencial obtenido de las tres muestras de *Zingiber officinale* es de 1,4847.

Los aceites esenciales en su gran mayoría muestran índices de refracción entre 1,40 y 1,61 cuando son leídos a 20°C, como podemos observar en la tabla 7, el valor encontrado del aceite esencial cumple con estos parámetros estudiados (Murillo et.al ,2014).

De acuerdo a Inca, 2012 los resultados del índice de refracción, indica que la muestra sí ha pasado por la desviación en el haz de luz del equipo.

3.1.3. Actividad Óptica específica.

En la tabla 8 se puede visualizar el valor promedio de la actividad óptica obtenida en las tres muestras de estudio.

Tabla 8. Actividad óptica específica del aceite esencial de *Z. officinale*

Muestras	Actividad óptica	\bar{X}	σ
ZO1	-16,2587 ^o	-12,109	5,9667
ZO2	-5,271 ^o		
ZO3	-14,7967		
ZO1: Primera muestra ZO2: Segunda muestra ZO3: Tercera muestra \bar{X} : Media aritmética correspondiente a las diferentes repeticiones σ : Desviación estándar			

Fuente: Investigación Experimental

Elaboración: La autora

La actividad óptica específica según lo que refleja la tabla 8, existe un valor promedio de -12,109, actualmente no existe información sobre este parámetro en estudios de *Zingiber officinale*

Según Pino et al., 2011 los valores que oscilan entre 12-28^o poseen una actividad dextrógira siendo estos ópticamente activos; como se puede observar nuestro valor posee un indicador negativo, lo que nos lleva a pensar que posiblemente el aceite esencial de *Z. officinale* posee en su mayoría compuestos levogiros, es decir, la luz polarizada rota en el sentido contrario de las manecillas de reloj, siendo la disposición de los átomos crucial en la determinación de la actividad biológica.

3.2. Composición química del aceite esencial de *Zingiber officinale*.

3.2.1. Análisis cualitativo y cuantitativo.

La composición química del aceite esencial de *Z. officinale* fue analizada por CG-EM y CG-FID en la columna no polar DB-5MS y columna polar HP-INNOWAX, proporcionando así el cromatograma, para su respectiva identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos.

En la figura 16 y 17 se presentan los perfiles cromatográficos del aceite esencial obtenidos en la columna DB-5MS y HP-INNOWAX, mediante la técnica CG-EM.

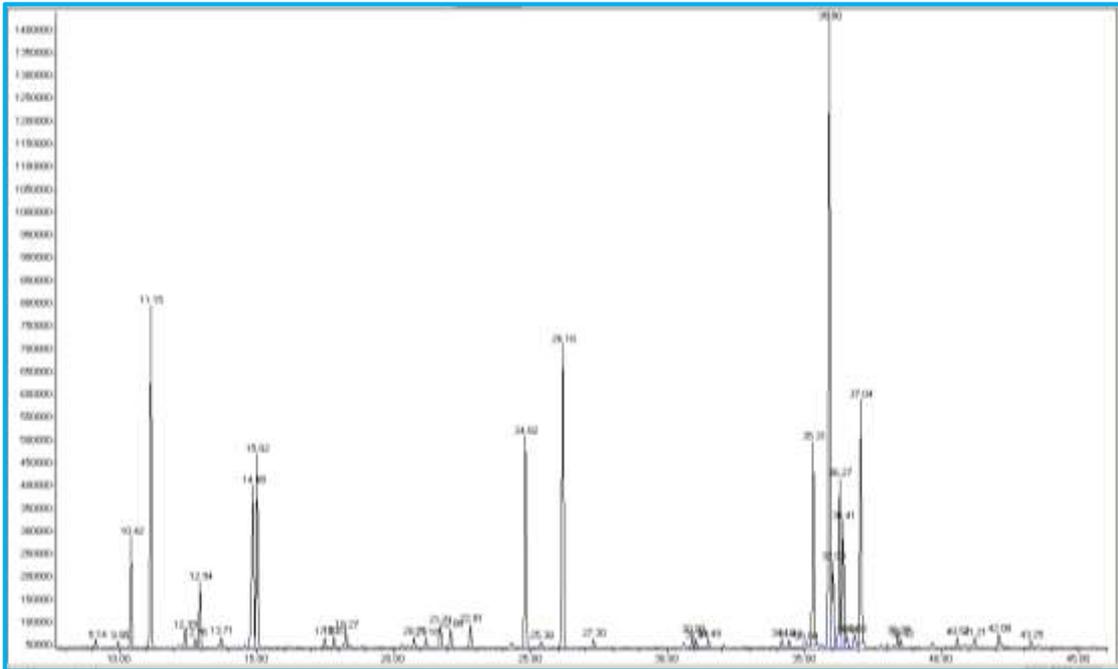


Figura 16. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *Zingiber officinale* en la columna no polar DB-5MS.

Fuente: Investigación Experimental
Elaboración: La autora

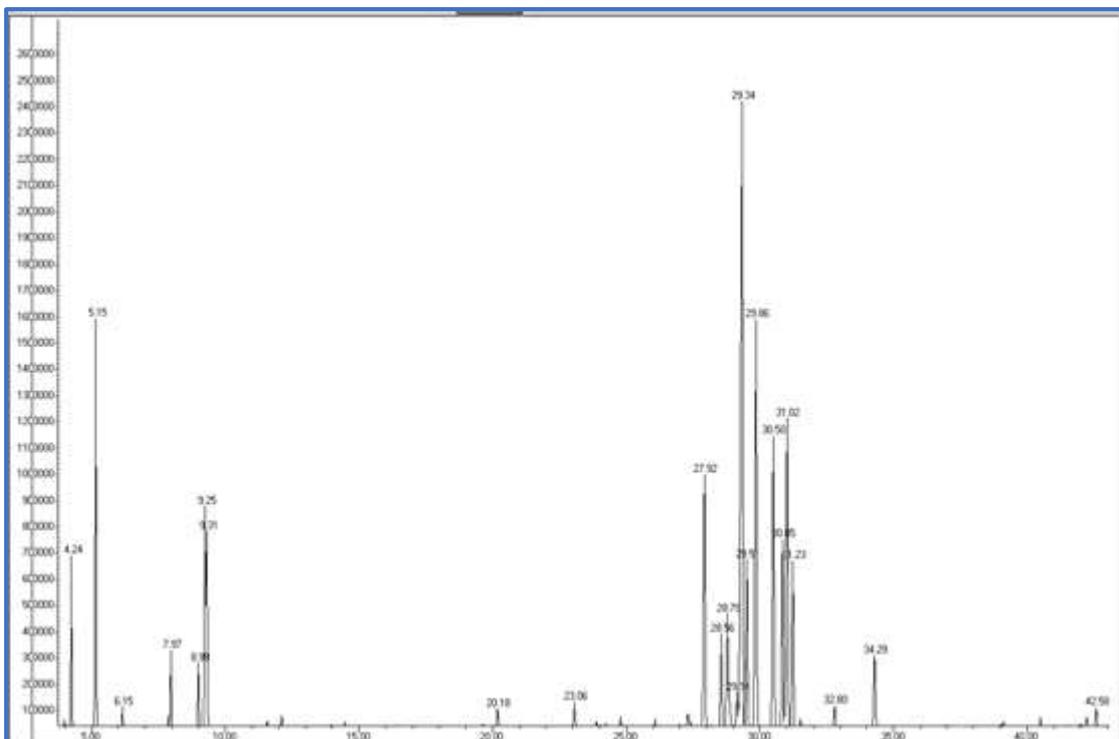


Figura 17. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *Zingiber officinale* en la columna polar HP-INNOWAX.

Fuente: Investigación Experimental
Elaboración: La autora

Según Pino et al., 2011 el tamaño de los picos y el tiempo de retención establecen la determinación cuantitativa y cualitativa de un compuesto respectivamente.

En la tabla 9 se detalla con precisión la composición química del aceite esencial de *Zingiber officinale* correspondiente a las columnas DB-5MS y HP-INNOWAX, los mismos que están dispuestos en orden de elución en la columna DB-5MS, resaltando los compuestos mayoritarios, se indican también los índices de Kovats calculados y los referidos en la literatura, el porcentaje promedio relativo y desviación estándar para los compuestos correspondiente a cada muestra analizada.

Tabla 9. Composición química del aceite esencial de *Z.officinale*.

DB5-ms															HP-Innowax														
Nº	COMPUESTOS	IK ^{cal}	IK ^{ref}	% de Cantidad Relativa ^a			\bar{X}	σ	IK ^{cal}	IK ^{ref}	% de Cantidad Relativa ^a			\bar{X}	σ														
				ZO1	ZO2	ZO3					ZO1	ZO2	ZO3																
1	Heptanol	909	896	0,22	0,16	0,19	0,04															
2	Tricyclene	926	926	0,165	0,17	1027	1014	0,21	0,21															
3	α -Pinene	936	939	1,79	2,96	2,24	2,33	0,59	1036	1032	2,21	3,8	2,89	2,97	0,8														
4	Camphene	951	954	5,48	9,56	7,2	7,41	2,05	1069	1076	6,39	11,08	8,41	8,63	2,35														
5	β -Pinene	978	979	0,48	0,37	0,42	0,08	1105	1118	0,35	0,61	0,46	0,47	0,13														
6	6-Methyl-5Hepten-2-one	986	985	0,28	0,21	0,24	0,05															
7	Myrcene	989	990	1,17	1,76	1,27	1,4	0,31	1164	1166	1,34	2,14	1,59	1,691	0,4														
8	α -Phellandrene	1006	1002	0,27	0,1707	0,22	0,07	1161	1140	0,35	0,35														
9	β - Phellandrene	1030	1029	4,16	6,48	4,13	4,93	1,34	1206	1198	3,33	5,39	3,27	3,99	1,21														
10	Eucalyptol	1033	1031	4,4	5,67	4,97	5,01	0,64	1205	1213	4,83	6,49	5,81	5,71	0,84														
11	γ -Terpinolene	1084	1088	0,33	0,22	0,27	0,08														
12	Citronelle	1152	1153	0,28	0,19	0,23	0,07														
13	Endo-Borneol	1172	1169	0,73	0,78	0,78	0,76	0,03														
14	trans- Carveol	1180	1180	0,64	0,6	0,59	0,61	0,03	1683	1669	6,54	6,8	6,73	6,7	0,12														
15	α -Terpinolene	1195	1199	0,96	0,78	0,85	0,86	0,09	1281	1290	0,34	0,34														
16	Neral	1239	1238	6,72	6,7	6,45	6,62	0,15														

17	Linalool-acetate	1251	1257	2,07	0,23	1,16	1,3
18	Geraniol	1268	1267	11,48	9,75	9,55	10,26	1,06	1735	1728	11,62	10,06	9,84	10,5	0,97
19	2-Undecanone	1293	1294	0,25	0,16	0,2	0,06
20	α-Copaene	1375	1376	0,41	0,39	0,49	0,43	0,05	1483	1460	0,48	0,57	0,66	0,57	0,08
21	β-Elemene	1388	1387	0,26	0,26	0,26	0
22	Benzene	1398	1403	0,19	0,19	1773	1775	4,08	5,64	6,39	5,37	1,18
23	β-Farnesene	1452	1456	0,3	0,32	0,31	0,02
24	β-Santalene	1459	1459	0,26	0,29	0,27	0,017
25	γ-Muurolene	1474	1479	0,28	0,41	0,34	0,09
26	Curcumene	1480	1480	5,27	6,23	7,12	6,21	0,93
27	Zingiberene	1494	1493	24,32	21,2	24,42	23,32	1,83	1721	1726	22,23	18,94	22,57	21,25	2
28	α-Amorphene	1498	1479	2,88	2,87	3,12	2,96	0,14
29	E,E- α-Farnesene	1504	1505	6,58	5,02	5,37	5,66	0,82	1753	1746	7,53	5,92	6,82	6,75	0,81
30	β-Bisabolene	1507	1505	4,01	4,04	4,78	4,28	0,44	1726	1728	4,05	3,87	4,66	4,19	0,41
31	γ- Cadinene	1510	1513	0,41	0,45	0,43	0,03

32	δ-Cadinene	1517	1523	0,64	0,55	0,72	0,64	0,08
33	β- Sesquiphellandrene	1523	1522	7,79	7,27	9,03	8,03	0,9	1768	1787	8,54	7,79	9,5	8,62	0,86
34	Germancrene-B	1558	1561	0,48	0,37	0,36	0,41	0,07	1818	1854	0,55	0,46	0,49	0,5	0,04
35	Nerolidol	1561	1563	0,43	0,23	0,26	0,3	0,11
36	Khusimone	1613	1604	0,51	0,32	0,34	0,39	0,1
37	α-Acorenol	1631	1633	0,61	0,4	0,43	0,48	0,11
38	Valerianol	1654	1659	0,54	0,41	0,42	0,45	0,07
39	Limonene	1197	1203	1,24	2,04	1,49	1,6	0,41
40	β-Maaliene	1716	1732	0,96	1,01	1,1	1,03	0,06
41	Germancrene-D	1699	1700	2,46	2,04	2,16	2,22	0,21
*TOTAL IDENTIFICADO							98,66		*TOTAL IDENTIFICADO					93,67	
<p>*=Sumatoria del porcentaje relativo de los compuestos identificados en ambas columnas ZO1=Aceite de la primera recolección; ZO2=Aceite de la segunda recolección; ZO3=Aceite de la tercera recolección ZO1,ZO2,ZO3: Promedios calculados de las tres recolecciones en base a su porcentaje de área \bar{X}=Promedio σ=Desviación estándar IK^{ca}=Índice de Kovats calculado IK^{ref}=Índice de Kovats reportado en la literatura.ver anexo IV</p>															

Fuente: Investigación Experimental
Elaboración: La autora

En la figura 18, se puede observar los porcentajes de los siete compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Z.officinale* en la columna DB5MS, los cuales son: Zingiberene (23,32%), Geraniol (10,26%), β - Sesquiphellandrene (8,03%), Camphene (7,41%), Neral (6,62%), Curcumene (6,21%), E, E α -Farnesene (5,66).

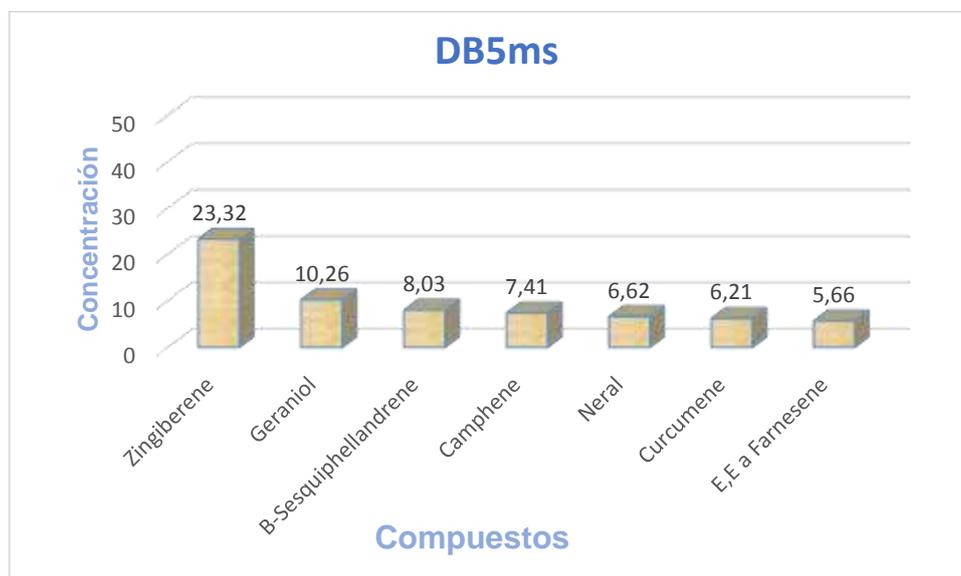


Figura 18. Compuestos mayoritarios en la columna no polar (DB5-ms)
 Fuente: Investigación Experimental
 Elaboración: La autora

Los porcentajes de los siete compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Zingiber officinale* en la columna HP-Innowax se representan en la figura 19, siendo estos: Zingiberene (21,25%), Geraniol (10,50%), Camphene (8,63%), β - Sesquiphellandrene (8,62%), Neral (6,62%), E, E α -Farnesene (6,75%), Carveol (6,70%), Eucalyptol (5,71%).

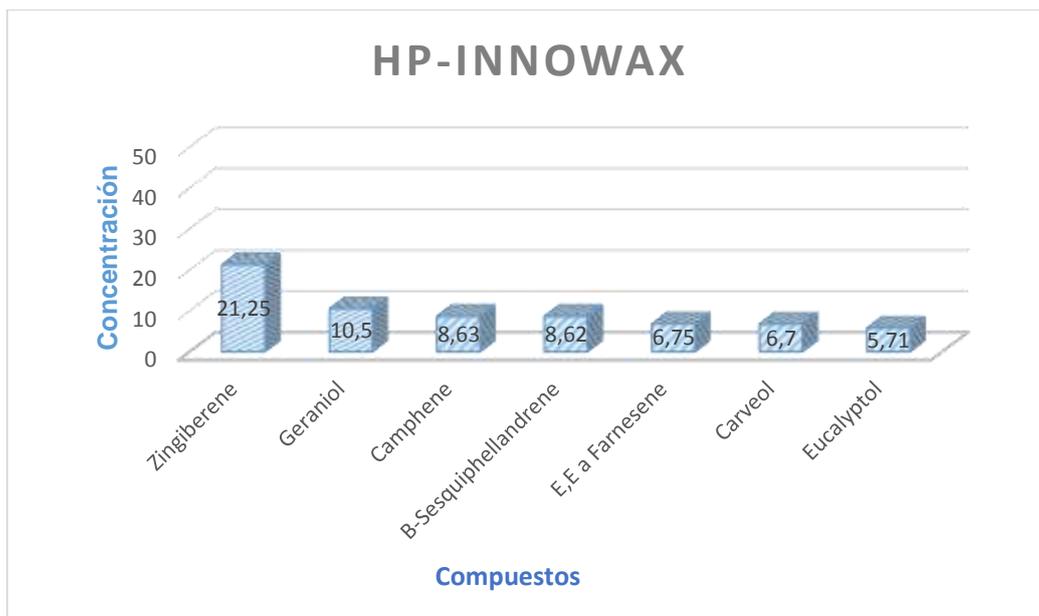


Figura 19. Compuestos mayoritarios en la columna polar HP-Innowax

Fuente: Investigación Experimental

Elaboración: La autora

El análisis cuantitativo se realizó mediante la comparación del porcentaje de cantidad relativa de los picos reflejados en el detector de ionización de llama (FID) con el porcentaje de cantidad relativa de los picos de los compuestos identificados en masas, tanto en la columna polar como la columna no polar.

En la tabla 10 se observa los resultados que representan los porcentajes de cantidad relativa para cada muestra analizada, el promedio y la desviación estándar.

Tabla 10. Comparación de la cantidad relativa (%) de los compuestos químicos del aceite esencial por CG-MS y CG-FID

Nº	COMPUESTOS	DB5										HP-Innowax										
		% de Cantidad Relativa						\bar{X}		σ		% de Cantidad Relativa						\bar{X}		σ		
		ZO1		ZO2		ZO3		MS	FID	MS	FID	MS	FID	ZO1		ZO2		ZO3		MS	FID	MS
1	Heptanol	0,22	0,32	0,16	0,29	0,19	0,31	0,04	0,02
2	Tricyclene	0,16	0,21	0,17	0,21	0,21	0,23	0,21	0,23
3	α -Pinene	1,79	2,01	2,96	3,5	2,24	2,62	2,33	2,71	0,59	0,75	2,21	2,13	3,8	3,77	2,89	2,9	2,97	2,93	0,8	0,82
4	Camphene	5,48	6,14	9,56	11,01	7,2	8,45	7,41	8,53	2,05	2,44	6,39	6,49	11,08	12,21	8,41	9,3	8,63	9,33	2,35	2,86
5	β -Pinene	0,48	0,62	0,37	0,47	0,42	0,55	0,08	0,11	0,35	0,4	0,61	0,69	0,46	0,52	0,47	0,54	0,13	0,15
6	6-Methyl-5Hepten-2-one	0,28	0,36	0,21	0,28	0,24	0,32	0,05	0,06
7	Myrcene	1,17	1,5	1,76	2,28	1,27	1,67	1,4	1,82	0,31	0,41	1,34	1,73	2,14	2,72	1,59	2,06	1,69	2,17	0,4	0,50
8	α -Phellandrene	0,27	0,27	0,17	0,17	0,22	0,22	0,07	0,07	0,35	0,4	0,35	0,4
9	β - Phellandrene	4,16	4,26	6,48	6,84	4,13	4,46	4,93	5,19	1,34	1,44	3,33	3,2	5,39	6,12	3,27	3,28	3,99	4,2	1,21	1,66
10	Limonene	1,24	1,27	2,04	2,14	1,49	1,58	1,6	1,66	0,41	0,44
11	Eucalyptol	4,4	4,06	5,67	5,47	4,97	4,83	5,01	4,79	0,64	0,71	4,83	7,39	6,49	11,012	5,81	8,54	5,71	8,98	0,84	1,85
12	γ -Terpinolene	0,33	0,33	0,22	0,25	0,27	0,29	0,08	0,06
13	Citronelle	0,28	0,5	0,19	0,13	0,23	0,32	0,07	0,26
14	Endo-Borneol	0,73	0,3	0,78	0,85	0,76	0,86	0,76	0,67	0,03	0,32
15	trans- Carveol	0,64	0,73	0,6	0,43	0,59	0,44	0,61	0,53	0,03	0,17	6,54	6,9	6,8	7,35	6,73	7,33	6,7	7,19	0,12	0,25
16	α -Terpinolene	0,96	0,92	0,78	0,77	0,85	0,86	0,86	0,85	0,09	0,07	0,34	0,33	0,34	0,33	0,19
17	Neral	6,72	6,82	6,7	7,02	6,45	6,94	6,62	6,93	0,15	0,1	0

18	Linalool-acetate	2,07	2,57	0,23	0,48	1,16	1,53	1,3	1,5	0
19	Geraniol	11,49	12,41	9,75	10,68	9,55	10,8	10,26	11,3	1,06	0,97	11,62	12,74	10,06	11,32	9,84	9,84	10,5	11,3	0,97	1,45	
20	2-Undecanone	0,25	0,27	0,16	0,2	0,2	0,23	0,06	0,05
21	α -Copaene	0,41	0,3	0,39	0,18	0,49	0,49	0,43	0,33	0,05	0,16	0,48	0,41	0,57	0,32	0,66	0,66	0,57	0,46	0,08	0,18	
22	β -Elemene	0,26	0,31	0,26	0,34	0,26	0,32	0	0,02
23	Benzene	0,19	0,21	0,19	0,21	4,08	3,04	5,64	4,76	6,39	4,89	5,37	4,23	1,18	1,03	
24	β -Farnesene	0,3	0,34	0,32	0,63	0,31	0,49	0,02	0,21
25	β -Santalene	0,26	0,16	0,29	0,31	0,27	0,24	0,017	0,11
26	γ -Muurolene	0,28	0,26	0,41	0,55	0,34	0,41	0,09	0,21
27	β -Maaliene	0,96	0,95	1,01	1,5	1,1	2,69	1,03	1,71	0,06	0,89	
28	Curcumene	5,27	4,62	6,23	5,46	7,12	5,86	6,21	5,32	0,93	0,63
29	Zingiberene	24,32	17,4	21,2	14,61	24,42	18,23	23,32	16,74	1,83	1,9	22,23	18,5	18,94	14,87	22,57	20,15	21,25	17,84	2	2,70	
30	α -Amorphe	2,88	3,73	2,87	2,92	3,12	3,97	2,96	3,54	0,14	0,56
31	E,E- α -Farnesene	6,58	8,88	5,02	7,54	5,37	8,46	5,66	8,3	0,82	0,69	7,53	6,01	5,92	4,65	6,82	5,42	6,75	5,36	0,81	0,68	
32	β -Bisabolene	4,01	3,41	4,01	3,24	4,78	4,98	4,28	3,88	0,44	0,96	4,05	3,51	3,87	3,49	4,66	4,21	4,19	3,74	0,41	0,41	
33	γ -Cadinene	0,41	0,38	0,45	0,43	0,43	0,41	0,03	0,04
34	δ -Cadinene	0,64	0,42	0,55	0,38	0,72	0,36	0,64	0,39	0,08	0,03

35	β- Sesquiphellandrene	7,79	7,33	7,27	6,78	9,03	8,35	8,03	7,49	0,9	0,8	8,54	7,71	7,79	7,17	9,5	8,8	8,62	7,89	0,86	0,83					
36	Germancrene-D	2,46	2,27	2,04	2,14	2,16	2,21	2,22	2,21	0,21	0,07					
37	Germancrene-B	0,48	0,25	0,37	0,16	0,36	0,18	0,41	0,19	0,07	0,04	0,55	0,54	0,46	0,43	0,49	0,5	0,5	0,49	0,04	0,06					
38	Nerolidol	0,43	0,95	0,23	0,11	0,26	0,12	0,3	0,39	0,11	0,48					
39	Khusimone	0,51	0,51	0,32	0,16	0,34	0,16	0,39	0,28	0,1	0,21					
40	α-Acorenol	0,61	0,5	0,4	0,39	0,43	0,41	0,48	0,43	0,11	0,06					
41	Valerianol	0,54	0,44	0,41	0,47	0,42	0,32	0,45	0,41	0,07	0,08					
*TOTAL IDENTIFICADO												98,65	97,07											*TOTAL IDENTIFICADO	93,66	93,20
<p>Compuestos según el orden de elución de la columna DB-5ms * = Sumatoria del porcentaje relativo de los compuestos identificados en la columna DB-5MS-Masas y DB-5MS-Fid ** = Sumatoria del porcentaje relativo de los compuestos identificados en la columna HP-Innowax-Masas y HP-Innowax-Fid Z01 = Aceite de la primera recolección; Z02 = Aceite de la segunda recolección; Z03 = Aceite de la tercera recolección MS: Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas FID: Cromatografía de Gases acoplada al Detector de Ionización de llama \bar{X} = Promedio σ = Desviación estándar</p>																										

Fuente: Investigación Experimental
Elaboración: La autora

En la figura 20, se puede observar los porcentajes de los siete compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Z.officinale* en la columna DB5 acoplada a FID, los cuales son: Zingiberene (16,74%), Geraniol (11,3%), Camphene (8,53%), E, E α -Farnesene (8,3%), β - Sesquiphellandrene (7,49%), Neral (6,93%), Curcumene (5,32%).

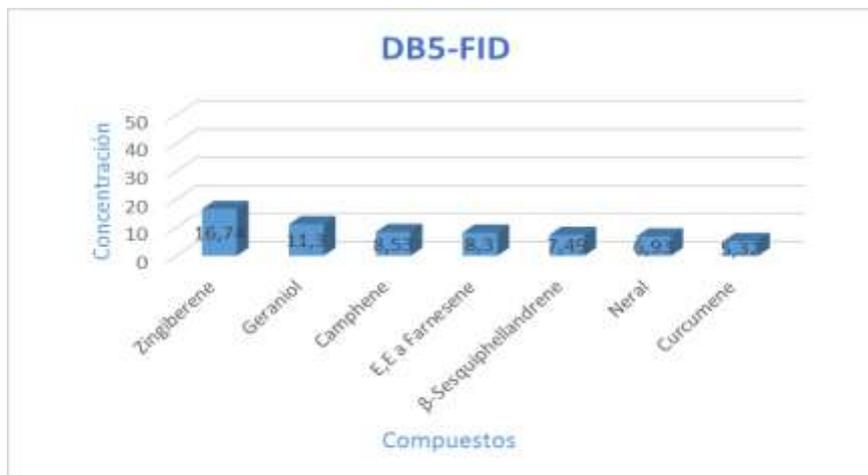


Figura 20. Compuestos mayoritarios en la columna no polar (DB5-FID)
 Fuente: Investigación Experimental
 Elaboración: La autora

Los porcentajes de los siete compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Zingiber officinale* en la columna HP-Innowax se representan en la figura 21, siendo estos: Zingiberene (17,84%), Geraniol (11,3%), Camphene (9,33%), Carveol (9,19%), Eucalyptol (8,98 %), β - Sesquiphellandrene (7,89%), E, E α -Farnesene (5,36 %).

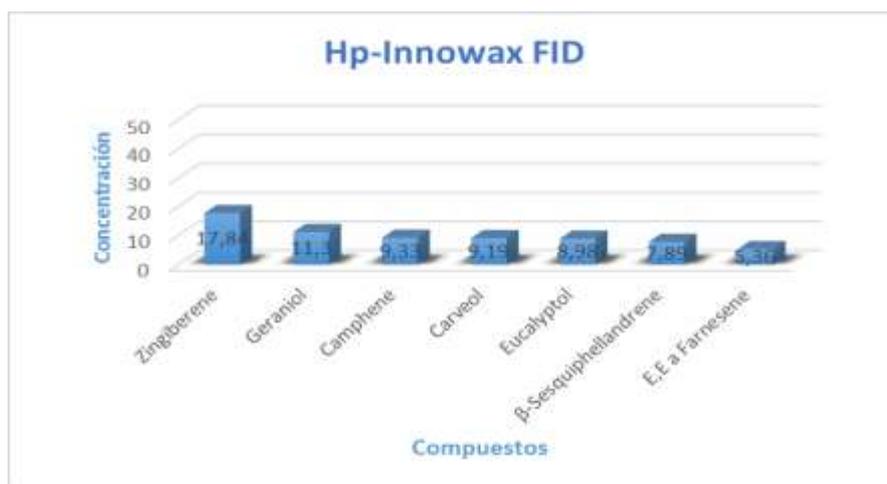


Figura 21. Compuestos mayoritarios en la columna polar (HP-Innowax-FID)
 Fuente: Investigación Experimental
 Elaboración: La autora

La determinación química empleada del aceite esencial de *Zingiber officinale* permitió identificar 41 compuestos químicos; correspondiente en la columna no polar DB5-ms a un total de 38 compuestos que representan un porcentaje de identificación de 98,65%, y en la columna polar Hp-Innowax un total de 21 compuestos con un porcentaje de identificación de 93,66%.

De acuerdo a Vásquez, Alva, & Marreros, 2001 el estudio químico reportado sobre el análisis del aceite esencial de *Zingiber officinale* muestra los compuestos mayoritarios como: Zingiberene (22,22%) , Curcumene (13,11%), β - Sesquiphellandrene (9,44%), Teraniol (3,33%), Myrcene (1,47%), Citral (1,25%), Geraniol (1,10%). Con respecto al presente estudio los compuestos mayoritarios presentes son: Zingiberene (23,32%), Geraniol (10,26%), β - Sesquiphellandrene (8,03%), Camphene (7,41%), Neral (6,62%), Curcumene (6,21%), E, E α -Farnesene (5,66).

Existe una presencia dominante de sesquiterpenos y monoterpenos, siendo notoria la predominancia de Zingiberene en ambos casos (Leyva et al , 2007), la diferencia entre los otros compuestos mayoritarios tanto en porcentaje de identificación como en la presencia o ausencia de ellos puede deberse al efecto del ambiente por factores como: altitud, precipitaciones, temperaturas, intensidad de la radiación solar, entre otros, en los que se desarrolla la planta, así mismo las condiciones de extracción, lo que afecta directamente a las diferencias entre las características cualitativas y cuantitativas (Muñoz, Vogel, & Razmilic, 2004).

3.3. Actividad biológica del aceite esencial de *Zingiber officinale*

3.3.1. Concentración mínima Inhibitoria (CMI) antibacteriana.

En la tabla 11 se muestran los resultados de CMI del aceite de *Zingiber officinale* frente a una cepa de bacterias Gram-negativas y tres cepas de bacterias Gram-positivas.

Tabla 11. Concentración mínima inhibitoria (ug/mL) de las muestras del aceite esencial de Z.O.

Microorganismos		Muestras de aceites		
		ZO1	ZO2	ZO3
		CMI (ug/mL)		
BACTERIAS	GRAM NEGATIVAS			
	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	10000	10000	10000
	GRAM POSTIVAS			
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	5000	2500	5000
	<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 9341)	1250	1250	1250
	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	10000	10000	10000
HONGOS	<i>Candida albicans</i> (ATCC 26555)	1250	1250	1250
Control positivo: Gentamicina (0,39 ug/mL) para E.coli; Tetraciclina (CMI 1,562 ug/mL) para S.aereus, M.luteus, E.faecalis. ZO: Código de muestras del aceite esencial de Zingiber officinale ZO1: Primera muestra ZO2: Segunda muestra ZO3: Tercera muestra				

Fuente: Investigación directa

Elaboración: La autora

Como observamos en la tabla 11 los compuestos químicos del aceite esencial de *Z.officinale* analizados frente a diversas cepas bacterianas no presentan actividad antimicrobiana alguna.

De acuerdo a los parámetros establecidos por Holetz et al. 2002, la evaluación de la actividad antimicrobiana se clasifica :

- **Buena:** CMI < 100 ug/mL
- **Moderada:** CMI de 100 a 500 ug/mL
- **Débil:** CMI de 500 a 1000 ug/mL
- **Inactiva:** más de 1000 ug/mL

Según a la evaluación de estos parámetros podemos establecer que la muestra es inactiva frente al grupo de bacterias analizadas tanto Gram-negativas como Gram-positivas.

Vásquez, Alva, & Marreros, 2001 menciona de acuerdo al estudio de extracción y caracterización del aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*), que las pruebas de sensibilidad empleadas muestran que el jengibre ejerce acción antimicrobiana frente a *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*, pero no ejerce acción antimicrobiana sobre *Salmonella tiphy*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas areuriginosa* y *Escherichia coli*. En comparación con el presente estudio existe similitud frente a la inactividad en bacterias Gram-negativas, y medianamente debil frente a *Staphylococcus aureus*, esto se puede deber a las concentraciones, volumen o condiciones de incubación empleadas en los estudios (Zapata et al, 2010).

Las bacterias Gram-negativas muestran resistencia intrínseca a una gran variedad de aceites esenciales, la misma que se relaciona con la superficie hidrófila de su membrana externa, ya que al poseer los aceites esenciales macromoléculas hidrofóbicas se vuelven incapaces de atravesar esta barrera; sin embargo las bacterias Gram-positivas suelen ser mas susceptibles al efecto antimicorbiano ya que en estas no existe una cubierta de lipopolisacáridos que evite la difusión de los compuestos hidrofóbicos presentes en los aceites esenciales (Rincón, Castaño, & Ríos, 2012).

Así también Arcila et al. 2004, establecen los parámetros a considerar para la evaluación antifúngica de los aceites esenciales, donde indica que deben presentar un CMI entre 0,65-1,27 mg/mL, comparando con el presente estudio la muestra analizada presenta un CMI de 1,25 mg/mL lo que nos ayuda a determinar que el aceite de *Z.officinale* es activo frente a *Candida albicans*.

En la actualidad no existen estudios de evaluación antifúngica relacionado con *Zingiber officinale*, pero sí de aceites de otra familia como la *Poaceae* como lo menciona (Pitarch, 2000), donde descarta una alta actividad de las mismas.

3.4. Actividad antioxidante del aceite esencial de *Z. officinale*

3.4.1. Método ABTS⁺.

Al calcular la capacidad antioxidante de muestra del aceite esencial de *Zingiber officinale*, mediante la técnica aplicada para ABTS⁺ a diferentes concentraciones de los estándares de referencia, se logró obtener los datos de absorbancia, que luego fueron sustituidos en la ecuación 2, llegando así a los valores de porcentaje de disminución para cada concentración del aceite esencial como se lo puede observar en la tabla 12.

Tabla 12. Datos del método ABTS⁺ para el aceite esencial

ACEITE ABTS ⁺			
Absorbancia Blanco	Concentración (mg/mL)	Absorbancia Determinada	Porcentaje de Disminución (%)
1,37	8,8	0,073	94,46
	2,6	0,466	65,95
	1,32	0,695	49,27

Fuente: Investigación directa

Elaboración: La autora

Al realizar los cálculos del aceite esencial de *Zingiber officinale* se observó que el porcentaje de disminución por el método ABTS⁺ alcanzó valores altos por encima de 50%, evidenciando así que en las muestras tratadas están presentes compuestos donadores de hidrógeno o electrones que pueden estabilizar al radical catiónico ABTS⁺ (Granados, Yañez, & Acevedo, 2014).

Según los datos evaluados existe una alta actividad antioxidante comprobada por el método ABTS⁺, revelando que posiblemente se deba a la presencia de geraniol, el cual se lo ha catalogado como un constituyente químico destacado por su actividad antioxidante, dicho compuesto, en nuestro estudio se presenta en un porcentaje alto (Carhupoma et al, 2005).

Los resultados obtenidos de la actividad antioxidante pueden ser expresados como IC50, la misma que se define como la concentración del antioxidante que disminuye la concentración del radical a un 50% de la cantidad inicial; es decir del 100 %. En el estudio es posible calcular el IC50 obteniendo 1,47 mg/mL.

No existen estudios sobre la actividad antioxidante del aceite esencial de *Z.officinale*, sin embargo se reportan algunos estudios de otros aceites esenciales recalcando un IC90 DE 9,1 ±1 ug/mL, comparando frente a nuestro trabajo se demuestra que la actividad antioxidante de *Zingiber officinale* es muy potente, estos datos sugieren que dicha actividad no se debe solamente a los compuestos mayoritarios, sino a un sinergismo existente entre todos sus componentes (Zapata et al , 2009).

3.4.2. Método DPPH.

En la tabla 13 se describe la absorbancia media obtenida a diferentes concentraciones de los estándares de referencia, calculado con la misma ecuación que se utilizó en el método ABTS⁺. Así mismo los datos de las absorbancias del aceite, aplicando la misma ecuación para encontrar la capacidad antioxidante de cada una de las muestras, como lo refleja la tabla 14.

Tabla 13. Datos del método DPPH para los estándares TROLOX.

DATOS DPPH			
TROLOX			
Absorbancia Blanco	Concentración	Absorbancia Determinada	Porcentaje de Disminución (%)
1,10	40	0,419	61,911
	30	0,570	49,911
	20	0,764	30,555
	10	0,930	15,455
	5	1,008	8,364
	2,5	1,059	3,728

Fuente: Investigación directa
Elaboración: La autora

Tabla 14. Datos de absorbancias medias y porcentaje de disminución del aceite esencial de *Zingiber officinale* por el método DPPH.

ACEITE (DPPH)			
Abs. Blanco	Concentración (mg/ml)	Absorbancia Determinada	Porcentaje de Disminución
1,10	30	0,145	86,81
	15	0,395	64,09
	7,5	0,608	44,7

Fuente: Investigación directa
Elaboración: La autora

Según los datos reflejados el porcentaje de disminución se encuentra por encima del 50%, lo cual determina que también existen compuestos antioxidantes que atrapen radicales libres o con capacidad de captación de radical hidroxilo (Carhupoma, Bonilla, Suarez, Vila, & López, 2005).

En general los valores del radical DPPH fueron parecidos en comparación a los valores obtenidos frente al radical ABTS⁺, sin embargo los datos obtenidos en la técnica ABTS⁺ presentan valores mucho más altos que la otra técnica; sugiriendo así que los compuestos antioxidantes presentes en el aceite esencial de *Z. officinale* son altamente hidrofílicos siendo más sensibles a la técnica de ABTS⁺ (Granados et al, 2014).

Al igual como sucede en el método ABTS⁺ obtenemos un IC50 de 11,425 mg/mL, el cual se encuentra en valores incluso más altos y potentes que en el método empleado con anterioridad, llegando así a la misma conclusión de una actividad antioxidante del aceite esencial de *Zingiber officinale* muy alta, lo cual es de mucho interés a nivel comercial.

CONCLUSIONES

- Los valores de las propiedades físicas obtenidas fueron: densidad relativa de 0,8846 g/cm³, el valor medio del índice de refracción fue de 1,4847 y la actividad óptica de -12,109°.
- En la composición química del aceite esencial se identificaron 41 compuestos químicos; correspondiente en la columna no polar DB5-ms a un total de 38 compuestos que representan un porcentaje de identificación de 98,65%, y en la columna polar Hp-Innowax un total de 21 compuestos con un porcentaje de identificación de 93,66%.
- Se identificaron siete compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Z.officinale*, los cuales fueron: Zingiberene (23,32%), Geraniol (10,26%), β-Sesquiphellandrene (8,03%), Camphene (7,41%), Neral (6,62%), Curcumene (6,21%), E, E α-Farnesene (5,66).
- El compuesto predominante fue el Zingiberene correspondiente a un porcentaje de 23,32 %, el cual se presentó en ambas columnas DB-5ms y HP-Innowax.
- Los resultados de la actividad antibacteriana del aceite esencial reflejó una actividad medianamente débil frente a *Staphylococcus aureus*, mientras que en las otras cepas evaluadas de *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis* fue inactivo en las concentraciones evaluadas, la actividad antifúngica frente a *Candida albicans* se presentó débil.
- El aceite esencial de *Zingiber officinale* presentó actividad antioxidante frente a la técnica ABTS⁺ con un IC50 DE 1,47 mg/mL, así mismo para la técnica DPPH no presentó dicha actividad presentó un IC50 de 11,425 mg/mL, esto se debe a que los compuestos antioxidantes presentes son altamente hidrofílicos siendo más sensibles a la técnica de ABTS⁺.

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios sobre los posibles factores externos que hacen que exista una variación de la composición química del aceite esencial de una especie.
- Realizar estudios posteriores para evaluar las propiedades atribuidas a la familia Zingiberaceae.
- Desarrollar técnicas de aprovechamiento del aceite esencial en el campo farmacéutico y alimenticio.
- Incluir más microorganismos en el estudio de actividad biológica, que sean de interés antimicrobiana para la salud.
- Analizar mediante otros métodos la capacidad antioxidante de *Zingiber officinale* para posteriores comparaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- Aca, A., Aldea, K., Arrué, K., & Valverde, K. (2010). *Biología Medica*.
- Acuña, O., & Torres, A. (2010). Aprovechamiento de las propiedades funcionales del jengibre (*Zingiber officinale*) en la elaboración de condimentos en polvo, infusión filtrante y aromatizante para quema directa. *Politécnica*, 29(1), 60-69.
- Adams, R. (2009). *Identificaion of essential oil components by gas chromatography/mass espectrometry* (4th edition ed.). Allured Publishing Corporation.
- Almeida, M. (2011). Sector de Hierbas Aromáticas y Certificación del sistema de Gestión de Inocuidad Alimentaria ISO 2200. *EIDOS*(4).
- Alvear, D. (2014). Aplicación de las especias: Anís, Mostaza, Vainilla, Cardamomo, Canela y Jengibre en 12 recetas con productos Autóctonos del Ecuador. *Universidad de Cuenca*, 7-9 ; 18.
- Alzamora, L., Morales, L., Armas, L., & Fernández, G. (2001). Medicina Tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. *REDALYC*, 62(2), 156-161.
- Andrew, L., Steven, M., Lyon, W., & Hayes, E. (2004). Enterococcus faecalis Tropism for the Kidneys in the Urinary Tract of C57BL/6J Mice. *American Society for Microbioloy Journal*, 76(4).
- Arcila, C., Loarca, G., Lecona, S., & González, E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *SCIELO*, 54(1).
- Balslev, H., Navarret, L., & Macía, M. (2008). Flora del Ecuador. *Enciclopedia de las plantas Útiles del Ecuador*, 1-3.
- Barquero, M. (2006). *Principios y Aplicaciones de la Cromatografía de gases*. San José: UCR.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales* (Vol. 2). Zaragoza: Acribia S,A.
- Carhupoma, Y., Bonilla, P., Suarez, S., Vila, R., & López, S. (2005). Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de Luma chequen (Molina) A.Gray"arrayan". *UNMSM*, 8(2), 1-7.

- Castañeda, M., Muñoz, A., Martínez, J., & Sthanshenko, E. (2007). Estudio de la composición química y actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *REDALYC*, 13(33), 165-167.
- Castillo, E., & Martínez., I. (2016). *Manual de Fitoterapia*. Barcelona: ELSEVIER.
- Castro, J. (2008). Composición del aceite esencial de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "coca" , actividad antioxidante y determinación antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, 17-19.
- Castro, S., Rodriguez, C., Perazzi, B., Radice, M., & Paz, S. (2006). Comparación de diferentes métodos para identificar las especies del género *Proteus*. *SCIELO*, 38(3).
- Ciappini, M., Stoppani, F., & Martinez, R. (2013). Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en mieles de tréboles, eucalipto y alfalfa. *Ciencias Tecnológicas*, 15(19), 45-51.
- Coloma, L., & Ron, S. (2001). Megadiverse Ecuador; amphibians, reptiles, birds and mammals. *Centro de Biodiversidad y Ambiente, Pontifica Universidad Católica del Ecuador. Quito*.
- Díaz, M., Rodriguez, C., & Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógenos de elevada importancia en la actualidad. *BIOCEN*.
- Fernández, D., Freire, E., Peñafiel, M., & Romero, G. .. (2015). Catálogo de especímenes tipo del Herbario Nacional del Ecuador, Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales. *Avances en Ciencias e Ingenierias*, 7(1), 39-44.
- Fonnegra, R., & Jiménez, S. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Forero, A., & Sánchez, S. (2008). Represión Catabólica por Carbono de Bacterias Gram-Positivas: Inteligencia alimenticia. *Bio-Tecnología*, 12(2), 24-26.
- Franklin, D., & Lowy, M. (1998). *Staphylococcus aureus* Infections. *The New England Journal of Medicine*, 520-522.
- Gallardo, M. (2011). Evaluación de tres tipos ed sustratos en la multiplicación de plantas endémicas con fines medicinales y el procesamiento en sobres para infusión del

sector de Buga bajo la comunidad de Paquiestancia de la Parroquia de Ayora. Cayambe-Ecuador. *Universidad Politécnica Salesiana*.

- Ginkel, V. (2003). *Apuntes del Master y Diplomatura de posgrado de la UAB "Plantas Medicinales y Fitoterapia. Módulo 2. Cultivo de plantas medicinales Tecnología y Producción*.
- Granados, C., Yañez, X., & Acevedo, D. (2014). Evaluation of Antioxidant Activity of the Essential Oil of *Myrcianthes leucoxylla* from Norte de Santander (Colombia). *SCIELO*, 25(3), 0718-0764.
- Granados, R., & Villaverde, C. (2003). *Bacteriología, Características y clasificación bacteriana. Virología, Características y técnicas bioquímicas*. Madrid: Paraninfo S.A.
- Gutiérrez, M. (2002). *La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: indentificación de compuestos de mal olor*.
- Gutiérrez, M., & Droguet, M. (2002). La Cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de Compuestos causantes de mal olor. *INTEXTER*, 35-37.
- Holetz, F., Pessini, G., Sanches, N., Garcia, D., Nakamura, C., & Dias, B. (2002). Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. *SCIELO*, 97(7), 1027-1031.
- Horna, G., Silva, M., Vicente, T., & Tamariz, J. (Marzo de 2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *SCIELO*, 16(1), 1018-130.
- Inca, A. (2012). Elaboracion de un fitofarmaco semisólido de acción adelgazante con diferentes dosis a base de alcachofa (*Cynara cardunculus* var *scolymus*) , Jengibre (*Zingiber officinale*) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*) administrado a personas para comprobar su eficacia. *Escuela Politécnica de Chimborazo*, 6-8.
- Konickal, M., & Mamiyil, S. (2013). Singnificance of gingers (Zingiberaceae) in Indian System of Medicine-Ayurveda: An overview. *Anciente Science of life Journal*, 32(4), 253-261.
- León, G., Osorio, M., Torrenegra, M., & Gil, J. (2015). Extracción, caracterización y actividad antioxidante del aceite esencial de *Plectranthus amboinicus* L. *SCIELO*, 49(4), 708-712.

- Leyva, M., Ferrada, P., Martínez, J., & Stashenko, E. (2007). Rendimiento y Composición del aceite esencial de Zingiber Officinale en función del diámetro de partícula. *Scientia et Technica*(33), 0122-1701.
- López, M. (2001). Plantas medicinales con acción terapéutica. *ELSEVIER*, 20(1), 20-21.
- Maas, H., & Maas, P. (2003). Zingiberaceae. *Instituto de Botanica de Sao Paulo*, 3, 349-351.
- Malbrán, C. (2012). Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 32(2), 17-21.
- Márques, M. (2015). Composición química de los aceites esenciales de Lavanda y Tomillo. Determinación de la actividad fúngica. *Universidad Politécnica de Valencia*, 16.
- Martínez, A. (2001). *Aceites Esenciales*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Muñoz, D., Vogel, H., & Razmilic, I. (2004). Variación de compuestos químicos en hojas de poblaciones de *Drimys* spp. (Magnoliophyta: Winteraceae) en Chile. *SCIELO*, 77(1), 43-50.
- Muñoz, F. (2002). *Plantas Medicinales y Aromáticas*. Madrid: Mundi Prensa S.A.
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2009). *Microbiología Médica*. Barcelona: ELSEVIER S,L.
- Narváez, P., Torres, J., Sánchez, F., & Ponce, L. (2005). Determinación por cromatografía de gases de alquil ésteres de ácidos grasos, en presencia de mono, di y triglicéridos. *REDALYC*(57), 58-62.
- Negrete, F., & Secaira, L. (2016). Elaboración y Estandarización de microencapsulados de aceites esenciales de cúrcuma (*Curcuma longa*) y jengibre (*Zingiber officinale*) como aditivos nutricionales para piscicultura. *UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA DE QUITO*, 25-29.
- Nogales, J. (2004). Medicina alternativa y complementaria. *SCIELO*, 42(4), 243-246.
- Novara, L. (2012). Zingiberaceae. *Universidad Nacional de Salta*, 2(8), 1-3.
- Olguín, L., & Rodríguez, H. (2004). *Cromatografía de Gases*. Obtenido de Universidad Nacional Autónoma de México. UNAM.
- OMS. (2013). Estrategia de la OOMS sobre medicina tradicional. 17 ; 28.

- Orgensen, P., & León, S. (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador. *Missouri Botanical Garden Press, St. Louis*, 302-315.
- Ortuño, F. (2006). *Manual Práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes* (Primera ed.). España: AIYANA.
- Ortuño, M. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes* (1 ed.). España: AIYANA.
- Pahissa, A. (2009). *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus*. Barcelona: ICG Marge S,L.
- Panizo, M., & Reviakina, V. (2001). Candida albicans y su efecto patógeno sobre las mucosas. *SCIELO*, 21(2), 1315-2556.
- Parrales, A., Reyes, M., & Pine, W. (2012). *Cromatografía de Gas Natural*. Obtenido de Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Patzelt, E. (2010). *Flora del Ecuador. Banco Central del Ecuador*.
- Pengelly, A. (1996). *The constituents of Medicinal Plants*. Cabi Publishing .
- Peña, A. (2007). Medicina alternativa: intento de análisis. *SCIELO*, 68(1).
- Pino, O., Sánchez, Y., Rojas, M., Rodríguez, H., Abreu, Y., Duarte, B., & Peteira. (2011). Chemical Composition and pesticidal activity of Melaleuca quinquenervia essential oil. *SICELLO*, 26(3), 1010-2752.
- Pino, O., Sánchez, Y., Roriguez, H., Correa, T., Demedio, J., & Sanabria, J. (2011). Caracterización química y actividad acaricida del aceite esencial de Piper aduncum subsp.ossanum frente a Varroa destructor. *SCIELO*, 26(1), 2224-4697.
- Pitarch, C. (2000). Antimicrobial evaluation of essential oils. *Natura Medica*, 1-6.
- Poma, E., Inocente, M., Ponce, J., & Zarzosa, E. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *SICIELO*, 15(1), 57-60.
- Prats, G. (2005). *Microbiología Clínica*. Madrid: Panamericana.
- Prats, G. (2006). *Microbiología Clínica*. Editorial Médica Panamericana.
- Puerta, A., & Mateos, F. (2010). Enterobacterias. *Complejo Universitario de Albacete*, 10(51), 3426-3428.

- Ramírez, L., & Marín, D. (Agosto de 2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Universidad Tecnológica de Pereira*, 15(42), 264-266.
- Rincón, C., Castaño, J., & Ríos, E. (2012). Actividad biológica de los aceites esenciales de *Acmella ciliata* (Kunth) Cass. *SCIELO*, 17(2).
- Rincón, J. (2006). *Medicina Alternativa y Terapias Complementarias*. Bogotá: SENA.
- Rincón, S., Panesso, D., Díaz, L., Carvajal, L., & Reyes, J. (2014). Resistencia a antibióticos de última línea en cocos Gram positivos: la era posterior a la vancomicina. *NCBI. Journal*, 34(1).
- Rodriguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Instituto Nacional de Salud Pública*, 44(5), 464-465.
- Rosales, V. (2014). *Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica y antioxidante del aceite esencial de Sarcobachis sydowii Trel. de la provincia de Zamora Chincipe*. Obtenido de Universidad Técnica Particular de Loja. Loja- Ecuador .
- Ryman, D. (1995). *Aromaterapia: Enciclopedia de las plantas aromáticas y de sus aceites esenciales*. Barcelona: KAIROS .
- Salgado, F. (2011). *Zingiber officinale*. *ELSEVIER*, 5(4), 67-73.
- Sánchez, M. (2007). Técnicas Cromatográficas. *Universidad Nacional Autónoma de México*, 3-132.
- Santana, O., Cabrera, C., Giménez, A., González, C., Sánchez, R., & Rodríguez, M. (2012). Perfil químico y biológico de aceites esenciales de plantas aromáticas de interés agroindustrial en Castilla La Mancha España. 63(2), 214-215.
- Torrenegra, M. (2014). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar extraído de especies de oregano (*Origanum vulgare*), oregano "Borde Blanco" (*Origanum vulgare ssp*) y oreganito (*Lippia alba mill*) cultivado en zona norte del departamento de Bolívar . *Universidad Nacional de Colombia*, 19-22.
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la Microbiología* (9 th ed.). Madrid, España: Panamericana.
- Ucar, A., Rojas, G., & Ballester, A. (2007). Acción de agentes químicos en la eliminación de *Candida albicans* sobre prótesis Dentales. *SCIELO*, 45(2).

- Uribarren, T., & Bazán, M. (2017). Generalidades de Micología. *UNAM*, 69-73.
- Usó, J., Gil, M., & Gomila, B. (2003). Endocarditis por *Micrococcus luteus*. *Microbiología Clínica. Enfermedades Infecciosas*, 21(2), 116-120.
- Vacas, O., Lee, J., Kim, H., Villota, S., & Nárvaez, A. (2015). Bioconocimiento de la flora ecuatoriana. *KRIBB*, 20-30.
- Vásquez, O., Alva, A., & Marreros, J. (2001). Extracción y caracterización del aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*). *Revista Amazónica de Investigación*, 1(1), 38-42.
- Vovides, A. (1993). Zingiberaceae. *Instituto de Ecología*.
- Whichello, D. (2005). *Aromaterapia. Remedios a través del aroma*. Barcelona: Amat S,L.
- Zambrano, E. (2015). Diversidad genética del jengibre (*Zingiber officinale*). A nivel molecular: Avances de la última década. *REDALYC*, 11(2), 190-199.
- Zapata, B., Durán, C., Stashenko, E., Correa, J., & Bentacour, L. (2009). Actividad citotóxica de aceites esenciales de *Lippia origanoides* H.B.K y componentes mayoritarios. *Revista Salud UIS*, 41(3).
- Zapata, B., Stashenko, E., Betancur, L., & Messa, A. (2010). Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. *Iberoamericana de Micología*, 27(2), 101-103.
- Zaporozhets, O., Krushynska, O., & Lipkovska, N. (2004). A new Test Method for the Evaluation of Total Antioxidant Activity of Herbal Products. *Agricultural and Food Chemistry Journal*, 52, 21-25.

ANEXOS

ANEXO I

DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA A 20°C

(Método de Referencia)

Según la AFNOR NF T 75-111 JUNIO 1982

PROPUESTA:

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

OBJETIVO DE APLICACIÓN:

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

REFERENCIAS:

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

PRINCIPIO:

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

NOTA:

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

APARATOS:

- Picnómetro de vidrio.

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

PROCEDIMIENTO:

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

EXPRESIÓN DE RESULTADOS:

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

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

Dónde:

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

m_0 : masa en gramos del picnómetro vacío.

m_1 : masa en gramos del picnómetro con agua.

m_2 : masa en gramos del picnómetro con aceite esencial.

Se expresarán los resultados con tres decimales

ANEXO II

DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

(Método de Referencia)

Según la AFNOR NF T 75-112 /1988

PRINCIPIO:

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

DEFINICIÓN:

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

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

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

APARATOS:

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

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

1.3330 para agua destilada.

1.4906 para el p-cimeno.

1.5685 para el benzoato de bencilo.

1.6585 para el 1-bromo naftaleno.

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

MODO DE OPERACIÓN:

Determinación

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

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

Resultados:

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

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

Dónde:

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

F = factor de corrección (0.0004)

t' = temperatura a la que se efectuó la lectura

t = temperatura a 20°C

Nota:

Expresar los resultados con cuatro cifras decimales.

La precisión de la determinación es de ± 0.0002 .

ANEXO III

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ÓPTICA

PRINCIPIO:

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

DEFINICIONES:

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

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

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

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

REACTIVOS:

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

SOLVENTE:

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

APARATOS:

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

El polarímetro constará de un plato de cuarzo de rotación óptica conocida, si esto es inaccesible, con una solución acuosa con un contenido de 26g de sacarosa anhidra pura

por 100ml de solución. La rotación óptica de esta solución es de +604 mrad en 200mm de pasta a una temperatura de 20°C. El instrumento deberá ser usado en la oscuridad.

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

Tubos polarimétricos: Usualmente de 100mm ± 0.5mm de longitud. Para muestras ligeramente coloreadas o de baja rotación óptica se deben usar tubos de más o menos 200mm ± 0.5mm, tubos de 50mm ± 0.05mm o 10mm ± 0.05mm o menos si es necesario para muestras fuertemente coloreadas. En la determinación se debe trabajar a 20°C o anotar la temperatura específica, utilice un tubo de ensayo de pared gruesa, equipado con un termómetro, asegurar la circulación del agua a la temperatura requerida. Para la determinación de la temperatura ambiente ver el tipo de tubo de ensayo que se debe utilizar, si bien es aconsejable utilizar los descritos en la parte anterior.

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

PROCEDIMIENTO:

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

RESULTADOS:

Cálculos y fórmulas

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

$$\alpha'D = A/I * 100$$

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

I = es la longitud del tubo usado en mm.

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

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

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

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

$$[\alpha] = \alpha'D/C$$

Dónde:

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

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

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

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

Dónde:

α = Actividad óptica calculada

αl = Actividad óptica leída

l = Dimensión del tubo (dm)=1

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

c = Concentración muestra (gr/ml)

ANEXO IV

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA DE LOS ÍNDICE DE KOVATS

1. Adams, R. (2009) Identification of Essential oil components by chromatography/ MS Spectrometry. Vol. 4
2. Adams, R.P.; (2006) González Elizondo, M.S.; González Elizondo, M.; Slinkman, E., DNA fingerprinting and terpenoid analysis of *Juniperus blancoi* var. *huehuentensis* (Cupressaceae), a new subalpine variety from Durango, Mexico, *Biochem. Syst. Ecol.*, 34, 205-211
3. Aidi Wannes, W., Mhamdi, B., & Marzouk, B. (2009). Variations in essential oil and fatty acid composition during *Myrtus communis* var. *italica* fruit maturation. *Food Chemistry*, 112(3), 621–626.
4. Dogan, E., Duman, H., Tosun, A., Kürkçüoğlu, M., & Baser, K. H. C. (2006). Essential Oil Composition of the Fruits of *Seseli resinosum* Freyn et Sint. and *Seseli tortuosum* L. Growing in Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 18(1), 57–59.
5. Figueiredo, C., Barroso, J., Pedro, L., & Scheeffe, J. (2007). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 22(November), 206–213.
6. Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R. (2003). Y De La Actividad Antioxidante in Vitro De. *Revista Academica Colombiana De Ciencias*, 27, 579–597.
7. Ruiz, S., Malagón, O., Zaragosa, T., Valarezo, E. (2010). Composition of the Essential oils of *Artemisia sodiroi* Hieron., *Siparuna eggertii* Hieron., *Tagetes filifolia* Lag. And *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze from Loja Ecuador. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(6), 676-691.
8. Sutour, S., Brades, P., Rocca Serra, D., Casanova, J., Tomi, F. (2008). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from *Mentha suaveolens* spp. *insularis*. *Flavour and Frangance Journal*, 23, 107-114.

ANEXO V

INDICE DE KOVATS

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

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

Dónde:

IK: Índice de retención de Kovats

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

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

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

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

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