



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Análisis enantiomérico y olfatométrico del aceite esencial de la planta
Hedyosmum purpurascens con flores femeninas en la provincia de Loja**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Cevallos Ludeña, María Belén

DIRECTOR: Montesinos Jaramillo, José Vinicio, Mgtr

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

Mgtr.

José Vinicio Montesinos Jaramillo

DOCENTE DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo denominado “Análisis enantiomérico y olfatométrico del aceite esencial de la planta *Hedyosmum purpurascens* con flores femeninas en la provincia de Loja” realizado por: Cevallos Ludeña María Belén; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Septiembre de 2018

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Cevallos Ludeña María Belén, declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: “Análisis enantiomérico y olfatométrico del aceite esencial de la planta *Hedyosmum purpurascens* con flores femeninas en la provincia de Loja”, de la titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo José Vinicio Montesinos Jaramillo director del presente trabajo; y eximo expresarme a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

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

f.....

Autor: Cevallos Ludeña María Belén

Cédula: 1104597149

DEDICATORIA

A Dios por darme la capacidad y la fuerza para cumplir con mis objetivos que he planteado en el transcurso de mi vida, además de ayudarme a sobrellevar los momentos difíciles.

A mis padres, Mercedes Esperanza Ludeña Díaz por su amor y compañía durante todo este camino y a José Cevallos Carrión por inculcarme buenos valores y brindarme sus sabios consejos. Mis hermanos Claudia, José Luis, y Karina por su cariño y apoyo. A cada uno de ellos por ser lo más valioso que Dios me ha dado...

María Belén Cevallos

AGRADECIMIENTOS

Primero a Dios y a la Virgencita de Guadalupe por iluminarme y darme la fortaleza para poder culminar con satisfacción esta etapa tan importante de mi vida. Por ponerme pruebas a lo largo del camino, ya que la fé ha producido en mi paciencia, aprendiendo, creciendo y a la vez mejorando como persona y profesionalmente.

Gracias a Dios por mis padres y hermanos, sobre todo por su amor, apoyo y preocupación en el avance y desarrollo de esta tesis, además por ser los promotores de mis sueños. Gracias por sus consejos y por cada una de sus palabras que me han guiado siempre.

A la Universidad Técnica Particular de Loja por haberme aceptado ser parte de ella y abierto las puertas para ser posible mi estudio en la carrera de Bioquímica y Farmacia

A mi tutor de tesis, Ingenieros y técnicos por brindarme sus conocimientos, por toda su paciencia para poder guiarme durante el desarrollo de mi trabajo.

Finalmente, a mis amigos más cercanos y compañeros de clase, ya que gracias a su compañerismo y apoyo moral he podido cumplir mis objetivos.

INDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
INDICE DE CONTENIDOS	vi
INDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	1
CAPITULO I	4
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
1.1. Plantas medicinales	5
1.1.1 Plantas medicinales en Ecuador	5
1.1.2. Familia Chloranthaceae.....	5
1.1.3. Genero <i>Hedyosmum</i>	5
1.1.4. Descripción botánica.....	6
1.1.5. <i>Hedyosmum purpurascens</i> Todzia	6
1.2. Aceites Esenciales	2
1.2.1. Definición de aceites esenciales	2
1.2.2. Aplicaciones y propiedades de los aceites esenciales.....	3
1.2.3. Extracción de aceites esenciales	3
1.2.4. Caracterización química de aceites esenciales.....	3
1.3. Metabolitos secundarios.....	5
1.3.1. Terpenos	5
1.4. Enantiómeros	6
1.5. Actividad biológica.....	6
1.6. Actividad antioxidante	7
CAPITULO II	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
2.1. Recolección de materia vegetal	10
2.2. Extracción del aceite esencial	10
2.2.1. Tratamiento de las muestras	11

2.2.2.	Determinación del rendimiento del aceite esencial.....	11
2.3.	Caracterización fisicoquímica del aceite esencial.....	12
2.3.1.	Determinación de la densidad relativa.....	12
2.3.2.	Determinación del índice de refracción.....	13
2.3.3.	Determinación de rotación óptica específica.....	14
2.4.	Análisis químico del aceite esencial.....	14
2.4.1.	Preparación de las muestras.....	14
2.4.2.	Corrida cromatográfica en la columna DB5-MS acoplado a espectrómetro de masas (CG-EM).....	14
2.4.3.	Corrida cromatográfica en columna DB5-MS acoplada al detector de ionización de llama (CG-FID).....	15
2.4.4.	Corrida cromatográfica en columna quiral acoplado a espectrómetro de masas	16
2.4.5.	Identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos.....	17
2.5.	Análisis olfatométrico del aceite esencial por CG-O.....	18
2.5.1.	Análisis de la dilución de extracto de aroma (AEDA).....	18
2.6.	Actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Hedyosmum purpurascens</i>	19
2.6.1.	Microorganismos utilizados en la evaluación de la actividad antimicrobiana	19
2.6.2.	Procedimiento	19
2.7.	Actividad antioxidante	20
2.7.1.	Método DPPH	20
2.7.2.	Método ABTS.....	21
CAPITULO III.....		22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		22
3.1.	Rendimiento del aceite esencial	23
3.2.	Determinación de Propiedades fisicoquímicas.....	24
3.2.1.	Densidad relativa del aceite esencial	24
3.2.2.	Índice de refracción de aceite esencial.....	24
3.2.3.	Actividad óptica del aceite esencial.....	25
3.3.	Composición química.....	26
3.4.	Composición enantiomérica.....	40
3.5.	Análisis olfatométrico	42
3.6.	Actividad antimicrobiana.....	44
3.7.	Actividad antioxidante	45

3.7.1. Ensayo DPPH	45
3.7.2. Ensayo ABTS.....	46
CONCLUSIONES.....	48
RECOMENDACIONES	49
BIBLIOGRAFÍA.....	50
ANEXOS.....	57
Anexo 1. Rendimiento	58
Anexo 2. Densidad Relativa.....	59
Anexo 3. Índice de refracción	60
Anexo 4. Rotación óptica	61
Anexo 5. Exceso enantiomérico.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Rendimiento de muestras de aceite esencial.....	23
Tabla 2. Densidad relativa de muestras de aceite esencial	24
Tabla 3. Índice de refracción de muestras de aceite esencial	25
Tabla 4. Actividad óptica de muestras de aceite esencial	26
Tabla 5. Composición química determinado por CG-EM comparado con CG-FID del aceite esencial de <i>H. purpurascens</i>	37
Tabla 6. Enantiómeros del aceite esencial de <i>Hedyosmum purpurascens</i>	41
Tabla 7. Compuestos activos en el olor del aceite esencial detectados por CG-O	44
Tabla 8. CMI de las muestras de aceite esencial de <i>H. purpurascens</i>	45
Tabla 9. Ensayo de DDPH en aceite esencial de <i>H. purpurascens</i>	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta <i>H. purpurascens</i> en el sitio de recolección ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 2. Muestra botánica para el Herbario de la UTPL.....	2
Figura 3. Esquema de desarrollo de la metodología	9
Figura 4. Área de recolección de la especie <i>H. purpurascens</i>	10
Figura 5. Equipo destilador de la UTPL.....	11
Figura 6. Envases etiquetados con la destilación respectiva.....	11
Figura 7. Imagen de aceite obtenido por destilación	12
Figura 8. Picnómetro con muestra de aceite	13
Figura 9. Refractómetro ABBE con aceite esencial.....	13
Figura 10. Celda con aceite esencial diluido en diclorometano	14
Figura 11. Condiciones operacionales para CG-EM con columna no polar DB5-MS.....	15
Figura 12. Condiciones operacionales para CG-FID con columna DB5-MS	16
Figura 13. Condiciones operacionales para Cromatografía con columna quiral MEGA-DEX DET-Beta.....	17
Figura 14. Curva de alcanos de la primera destilación	18
Figura 15. CG-O con columna DB5-MS	19
Figura 16. Material empleado en la actividad antimicrobiana	20
Figura 17. Perfil cromatográfico del aceite esencial de <i>Hedyosmum purpurascens</i>	27
Figura 18. Exceso enantiomérico del aceite esencial de <i>H. purpurascens</i> : 1) S (+) camphenol, R (-) camphenol 2) S (+) linalool, R (-) linalool 3) S (+) terpinen-4- ol, R (-) terpinen-4- ol 4) S (+) copaene <β>, R (-) copaene <β> 5) S (+) amorphene <γ> y R (-) amorphene <γ>.	41
Figura 19. Superposición del espectro de masas con el Aromagrama del aceite	43
Figura 20. Aromagrama AEDA del aceite esencial de <i>H. purpurascens</i>	43
Figura 21. Muestras en Ensayo DPPH con cambio de coloración purpura a amarillo	46
Figura 22. Muestras en ensayo ABTS con cambio de coloración azul a transparente.....	47

RESUMEN

En este trabajo se realizó el análisis del aceite esencial de la planta *Hedyosmum purpurascens*, extraído mediante destilación por arrastre de vapor, obteniendo un rendimiento de 0,02%. Presentó una densidad de 0,93 g/cm³, índice de refracción de 1,484 y actividad óptica de +32,90°. Se identificó un total de 67 compuestos correspondiendo al 93,78% del total analizado, los compuestos mayoritarios fueron: el Germacrene D (19,5%), Caryophyllene <(Z)-> (7,3%), Cadinene <γ-> (6,1%) Linalool (5,8%), y Cis ocimene (5,2%). Además, se determinó la distribución y el exceso enantiomérico de 8 pares de enantiómeros: Pinene <β->, Camphenol <6->, (+) Linalool, Terpinen-4-ol, Copaene <β->, Amorphene <γ->, Cubebol, Muurolol< epi α->. En el análisis olfatométrico se obtuvo el factor de dilución (FD) de los componentes activos de olor del aceite, dentro de los cuales se identificó 8 compuestos; siendo el Linalool con el mayor FD. Se evaluó la actividad antimicrobiana, sin presentar actividad inhibitoria; y se evaluó la actividad antioxidante, resultando débil en ambos ensayos espectrofotométricos: DPPH y ABTS.

Palabras claves: *Hedyosmum purpurascens*, Chloranthaceae, Germacrene D, CG-EM.

Abstract

In this work the analysis of the essential oil of the plant *Hedyosmum purpurascens*, extracted by steam distillation, obtaining a yield of 0.02%, was carried out. It presented a density of 0.93 g/cm³, refractive index of 1.484 and optical activity of +32.90°. A total of 67 compounds were identified corresponding to 93.78% of the total analyzed, the major compounds were: Germacrene D (19.5%), Caryophyllene <(Z) -> (7.3%), Cadinene <γ- > (6.1%), Linalool (5.8%), and Cis ocimene (5.2%). In addition, the distribution and enantiomeric excess of 8 pairs of enantiomers were determined: Pinene <β->, Camphenol <6->, (+) Linalool, Terpinen-4- ol, Copaene <β->, Amorphene <γ->, Cubebol, Muurolol <epi α->. In the olfactometric analysis, the dilution factor (FD) of the active components of odor of the oil was obtained, within which 8 compounds were identified; being the Linalool with the highest FD. The antimicrobial activity was evaluated, without presenting inhibitory activity; and the antioxidant activity was evaluated, being weak in both spectrophotometric tests: DPPH and ABTS.

Keywords: *Hedyosmum purpurascens*, Chloranthaceae, Germacrene D, CG-EM.

INTRODUCCIÓN

Existe una variedad de productos químicos para combatir los microorganismos patógenos, controlar su desarrollo, y evitar la producción de enfermedades, por lo que se busca que estos sean los más tóxicos para los microorganismos, pero con efectos nocivos mínimos para el hombre (Martinez, 2005).

A partir de las plantas se pueden aislar muchos metabolitos secundarios que generalmente no son tóxicos, dentro de los cuales se destacan algunos que son importantes en el área de la industria, medicina y en varios productos empleados diariamente. Estas sustancias reciben el nombre de aceites esenciales (Stashenko, 2009).

En la familia Chloranthaceae el género *Hedyosmum* posee pocos estudios a pesar de ser el más abundante. Los monoterpenos y sesquiterpenos se consideran los principales componentes en el aceite esencial de la mayoría de las plantas de esta familia (Cao, Peng, Shi, & Xiao, 2008). En un estudio se identificaron monoterpenos especialmente el sabineno y sesquiterpenos oxigenados, principalmente furanodieno, estos fueron los principales componentes encontrados en los aceites de *H. mexicanum*. Los hidrocarburos monoterpénicos también fueron el principal grupo de componentes en el aceite de *H. bonplandianum*. Mientras que el aceite de *H. costaricensis* estaba constituido principalmente por hidrocarburos sesquiterpénicos especialmente germacreno-D (Mundina et al., 2000).

En otro trabajo reportaron la composición química y enantiomérica del aceite esencial de *H. scrubum* macho y hembra recolectado en la Provincia de Loja. En la hembra se identificó en su mayoría monoterpenos oxigenados, mientras que en el macho hubo sesquiterpenos (Herrera, Morocho, Vidari, Bicchi, & Gilardoni, 2017).

Por ello, el presente proyecto surgió de la necesidad de poder analizar la composición química y enantiomérica del aceite esencial de *Hedyosmum purpurascens*, con el fin de aprovechar de una mejor manera los recursos naturales que tenemos en la provincia de Loja para beneficio de la industria, la farmacia, la agricultura y la medicina; ya que se podría disponer del estudio de dicho aceite para analizar su posible utilización.

El objetivo principal del presente trabajo es determinar las propiedades químicas, enantioméricas, y físicas del aceite esencial de *Hedyosmum purpurascens*, además de evaluar la actividad biológica frente a microorganismos Gram positivos, Gram negativos y hongos; conjuntamente con su actividad antioxidante mediante ensayos DPPH y ABTS.

CAPITULO I
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Plantas medicinales

De acuerdo con la OMS 2003, las plantas medicinales son especies vegetales usadas con fines terapéuticos, que necesitan cuidados en su uso, ya que pueden ofrecer riesgos a la salud al ser manipuladas de forma errónea (Borges, 2001) (França, Souza, Baptista, & Britto, 2008).

1.1.1 Plantas medicinales en Ecuador

Hace aproximadamente 12000 años el hombre llegó a lo que hoy es Ecuador (Almeida, 2000). Los primeros habitantes fueron pescadores, cazadores, recolectores, tras ellos otras culturas originarias de las regiones continentales se alimentaron de semillas frutos tallos raíces, obteniendo especias o condimentos de plantas, para vestimenta, venenos y tratamiento de dolencias o enfermedades (Torre & Macía, 2008). Su uso ha demostrado que es una de las mejores alternativas que benefician a las personas y comunidades sobre todo del área rural que mantienen y conservan el uso de plantas medicinales. (Toscano, 2006)(Bekalo, Woodmatas, & Woldemariam, 2009)

El herbario QCA de la Pontificia Universidad católica del Ecuador en los últimos 15 años ha ido aumentando el número de colecciones, llegando a contar hoy en día con más de 200.000 especímenes, de los cuales más de 5.000 deben tener en sus etiquetas información etnobotánica que indica nombres vernáculos y uso de las plantas. El 60% de estas especies son medicinales (Rios, Koziol, Borgtoft, & Granda, 2007).

1.1.2. Familia Chloranthaceae

Según (Todzia, 1998) esta familia cuenta con cuatro géneros y cerca de 75 especies. Con distribución en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Rossi, 2002). Considerada primitiva, posee una característica de células secretoras en hojas y tallos, lo que es común con la familia Angiospermae (Kirchner, Wisniewski, Cruz, Biavatti, & Netz, 2010).

En el género *Hedyosmum*, las plantas medicinales, se usan sobre todo como: estimulante, tonificante, antifúngicas, y antidiarreicas, y en alimentos como: bebidas tonificantes y para proporcionar el sabor a los licores (Kirchner et al., 2010).

1.1.3. Genero *Hedyosmum*

Hedyosmum (del griego: olor dulce), es el género más abundante que solo ocurre en las Américas, abarca alrededor de 46 especies tropicales y subtropicales (Kirchner et al., 2010). Una de estas especies se encuentra en el sureste de Asia (Ulloa & Jorgensen,

1993). La infusión de las hojas de estas plantas se consume en forma de té, o bien, como sustituto de café. A algunos se les atribuyen propiedades medicinales contra variadas afecciones (Todzia, 1998).

1.1.4. Descripción botánica

Son arbustos dioicos que poseen hojas aserradas con peciolo ensanchados y unidos en la base formando una vaina; las inflorescencias masculinas se presentan en amentos, y las femeninas capitadas. Las flores masculinas son ebracteadas, aperiantadas con estambre, y anteras biloculares sésiles. Las flores femeninas son bracteadas, con perianto fusionado total o parcialmente al gineceo. Finalmente su fruto está conformado por endocarpio y exocarpio. Su hábitat es en altitudes a partir de 500 hasta 2800m (Figura 1) (Ludlow, 1981).



Figura 1. Planta *H. purpurascens* en el sitio de recolección

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

1.1.5. *Hedyosmum purpurascens* Todzia

1.1.5.1. Descripción taxonómica

Reino: Plantae

Género: *Hedyosmum*

División: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Chloranthales

Familia: Chloranthaceae

1.1.5.2. Descripción botánica

Árboles o arbustos dioicos de 2 a 4 m de altura, corteza gris, madera blanca torneada anaranjada cuando está expuesto al aire; hojas pequeñas estrechamente ovaladas de color púrpura u obtusas en sus ápices; porción de pecíolos verdes o púrpura; con flores pistiladas trigonales de 3 a 4 mm de largo, con poro oscuro en cada cara del ovario, estigmas lineales con coloración púrpura y papilas muy cortas; tallos jóvenes lisos, cuadrados, y purpuras, mientras que los tallos grandes tienen nudos ligeramente hinchados y entrenudos de 1.2 cm a 3.3 cm de altura. Fructíferos globosos de color púrpura a negro con diámetro de 0.8 cm a 1.2cm; no posee semillas maduras (Figura 2) (Todzia, 1998).



Figura 2. Muestra botánica para el Herbario de la UTPL

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

1.1.5.3. Hábitat

Conocido solo en la Provincia de Loja-Ecuador, en bosques nublados a elevaciones de 2300-2600 m (Todzia, 1998). Dentro de las carreteras de Loja-Zamora, Catamayo, Valladoid o Saraguro, e incluso en el parque Nacional Podocarpus. Algunos de sus hábitats están siendo deforestados para la producción de carbón vegetal (León et al., 2011).

1.2. Aceites Esenciales

1.2.1. Definición de aceites esenciales

Başer & Buchbauer (2010) define a los aceites esenciales como productos vegetales naturales con diversidad de propiedades biológicas. La palabra "biológico" se refiere a

todas las actividades que estas mezclas de compuestos volátiles (principalmente mono y sesquiterpenoides, benzoides, fenilpropanoides, entre otros) ejercen sobre humanos, animales y otras plantas (Başer & Buchbauer, 2010). Se caracterizan por su olor fuerte, y son sintetizados por plantas como metabolitos secundarios jugando un papel muy trascendente en la protección de las mismas al cumplir su función como antibacterianos, anti fúngicos, antivirales e insecticidas (Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008).

1.2.2. Aplicaciones y propiedades de los aceites esenciales

Los aceites aumentan la regulación del metabolismo gastrointestinal, aceleran la eliminación del epitelio. Adicional a ello, estimulan la actividad de enzimas digestivas en la mucosa del páncreas e intestino. Dentro del grupo de los que mejoran la digestibilidad fecal están los extractos de romero, salvia, tomillo, canela y orégano (Zekaria, 2007).

Se ha demostrado que los componentes de los aceites esenciales pueden ser anticancerígenos; debido a que los terpenos o también conocidos como isoprenoides, son componentes que provocan modificación celular reduciendo el riesgo de cáncer (Thormar, 2010).

Por otro lado, mejoran la eficacia de las células que intervienen en la respuesta inmune, como ocurre en situaciones de estrés entérico. El timol y carvacrol debido a ser secuestrantes de radicales libres poseen actividad antioxidante marcada. Así también el orégano ejerce un efecto antioxidante (Zekaria, 2007).

1.2.3. Extracción de aceites esenciales

Según (Eikani, Golmohammad, & Rowshanzamir, 2007) para la obtención de aceites esenciales se emplean métodos de extracción, que pueden ser la extracción supercrítica o subcrítica y la destilación por arrastre de vapor. Este último es muy usado dentro de la industria; posee la ventaja de usar el agua como solvente, ya que no afecta al aceite extraído, a diferencia de otros solventes, los cuales no son de grado alimenticio, como el hexano usado en la extracción Soxhlet. Además, otra ventaja de la extracción por arrastre de vapor es que no se lleva a cabo la purificación luego de su ejecución.

1.2.4. Caracterización química de aceites esenciales

Las técnicas más usadas en la caracterización y separación de aceites son: Cromatografía de líquidos (LC), cromatografía en capa fina (CCF), y además el análisis de los componentes del aceite se puede realizar mediante cromatografía de gases (CG) (Zeković, Adamović, Ćetković, Radojković, & Vidovića, 2011).

La cromatografía en papel es aplicable a constituyentes vegetales solubles en agua, carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos como taninos. La cromatografía en capa delgada es útil para la separación de componentes líquidos solubles en lípidos, esteroides, carotenoides, quinonas y clorofilas en donde también es útil la cromatografía en columna; mientras que la cromatografía de gases es aplicada a componentes volátiles como ácidos grasos y monoterpenos (Saavedra, 2016).

1.2.4.1. Cromatografía de gases

Según (USP, 2009) para realizar un análisis cualitativo y cuantitativo se emplea la moderna técnica de cromatografía de gases. Se caracteriza por poseer una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria líquida inmovilizada o sólida. Las fases estacionarias líquidas están disponibles en columnas capilares o rellenas.

1.2.4.1.1. Cromatografía de gases acoplado a masas (CG-EM)

Hay fabricantes de instrumentos que ofrecen equipos de cromatografía de gases que se adaptan con diferentes espectrómetros de masas de barrido rápido (Skoog & Holler, 2016).

Se basa en inyectar una mezcla de compuestos, que se separa en la columna, consiguiendo la elución sucesiva de los componentes aislados en forma individual, trasladándose rápidamente al espectrómetro de masas. Luego se registran como picos cromatográficos, y se identifican por medio de su espectro de masas correspondiente (Gutiérrez, 2002).

La espectrometría de masas es la herramienta de mayor aplicación, en el sentido de que esta técnica es capaz de proporcionar información acerca de: la composición elemental de las muestras; la estructura de las moléculas inorgánicas, orgánicas y biológicas; de la composición cualitativa y cuantitativa de mezclas complejas y de las relaciones isotópicas de átomos en las muestras (Skoog & Holler, 2016). A pesar de ello, la identificación es limitada cuando un solo pico cromatográfico contiene varios compuestos, por lo que los espectros de masa grabados son difíciles de interpretar (Merfort, 2002).

1.2.4.1.2. Cromatografía de gases acoplado a FID (CG-FID)

Es la técnica cromatográfica más eficiente para separar mezclas volátiles, debido a su alto poder de resolución y disponibilidad de detección universal (Merfort, 2002).

En cromatografía de gases, el detector de ionización de llama (FID), es el más aplicable, ya que presenta mayor sensibilidad y respuesta universal, lo que quiere decir que

responde casi de la misma forma por unidad de masa de analito, sin actuar sobre su estructura química mientras tenga carbonos orgánicos (Arroyave García & Villa Flórez, 2011).

Según (Arroyave García & Villa Flórez, 2011) consiste en un quemador, en donde el efluente de la columna se mezcla con hidrógeno. Este gas mezclado se enciende mediante una chispa eléctrica, dando como producto una llama a temperatura alta. Al exponerse a elevadas temperaturas, los compuestos orgánicos pirolizan, dando lugar a iones y electrones, conductores de electricidad a través de la llama.

1.2.4.1.3. Análisis olfatométrico por Cromatografía de Gases (CG-O)

GC-O es una técnica basada en la relación entre los picos del cromatograma de sustancias percibidas por el humano y por el detector del equipo, empleada por décadas en perfumería, permitiendo la evaluación de componentes con olor activo en mezclas de tipo complejas (Barbara D'Acampora, Casilli, Dugo, Dugo, & Mondello, 2007).

Es una herramienta para el estudio de matrices de sabores y fragancias, que se aplica a una amplia gama de muestras mediante el uso de diferentes métodos de evaluación (Van Ruth, 2001); también se ha efectuado la determinación de propiedades sensoriales de enantiómeros por medio de GC-O enantioselectiva (B D'Acampora et al., 2006).

Según (Bascón, 2016) tiene dos detectores, que pueden ser el espectrómetro de masas o FID y un detector olfatométrico. Una de las técnicas más empleadas en olfatometría es AEDA, cuyo objetivo es detectar olores y luego describirlos, finalmente los resultados son representados en un aromagrama (Van Ruth, 2001).

1.3. Metabolitos secundarios

Se los denomina secundarios debido a que no cumplen con alguna función definitiva en la planta, y no todas las plantas los poseen (Vilela, González, & Ravetta, 2011). Se han usado en productos medicinales, perfumes, somníferos, venenos, y alucinógenos, desde antes de conocer su naturaleza química (Macías, Molinillo, Valera, & Galindo, 2007). Dentro de los metabolitos secundarios tenemos:

1.3.1. Terpenos

Son una serie de sustancias con actividad biológica que conforman la planta. Tienen origen biosintético común, una estructura química diferente, procedentes de la condensación del isopreno (2-metil-1,3-butadieno), hidrocarburo con cinco átomos de carbono (López, Miguel, & Aleixandre, 2012).

1.3.1.1. Monoterpenos

Son compuestos orgánicos volátiles, que se forman por dos unidades de isopreno (Mohammad, Ki-Hyun, & Jeong, 2014).

Son los componentes clave de los aceites esenciales, pueden ser extraídos a partir de vegetales como zanahoria, y de segmentos de plantas como las hojas del pino y frutas (Banthorpe, Charlwood, & Francis, 1971) (Michlmayr et al., 2012).

1.3.1.2. Sesquiterpenos

Según (Awouafack, Tane, Kuete, & Eloff, 2013) son terpenoides (C_{15}) conformados de tres unidades de isopreno. Se encuentran especialmente en plantas superiores y en muchos otros seres vivos marinos y hongos. Naturalmente, se exhiben como hidrocarburos o en formas oxigenadas, incluidas lactonas, alcoholes, ácidos, aldehídos y cetonas. Los sesquiterpenos también engloban aceites esenciales y constituyentes aromáticos con diversas actividades farmacológicas (Awouafack et al., 2013).

1.4. Enantiómeros

La propiedad de quiralidad se atribuye a un compuesto que puede existir como dos formas de imágenes espejos no superponibles, similares a nuestras manos izquierda y derecha. Estas dos formas se definen como enantiómeros (+) y (-) en función de su interacción con la luz polarizada en el plano (Harner, Wiberg, & Norstrom, 2000). Los compuestos quirales ocurren con frecuencia en extractos de plantas tales como aceites esenciales y agentes aromatizantes (Özek, Tabanca, Demirci, Wedge, & Can Başer, 2010).

En cuanto a la separación de enantiómeros y el exceso enantiomérico (ee), tienen gran relevancia en los campos de sabores y aceites esenciales (EO), no solo para caracterizar una matriz o extracto vegetal o para evaluar la ruta biosintética de uno o más de sus componentes; sino también para establecer su origen, y para identificar posibles adulteraciones (Bicchi, D'Amato, & Rubiolo, 1999).

1.5. Actividad biológica

Los aceites esenciales con propiedad antimicrobiana generalmente contienen compuestos fenólicos que se difunden a través de la membrana, provocando la alteración de su permeabilidad, fluidez y alteración de transporte de iones, como el carvacrol, eugenol, timol, los cuales tienen la capacidad de actuar sobre la membrana celular (Zekaria, 2007) (Trombetta et al., 2005).

Las técnicas comúnmente usadas en la evaluación de la actividad biológica son: difusión por discos en agar, usada para reportar generalmente datos cualitativos; mientras que la dilución en medio líquido de cultivo y en agar, para datos cuantitativos (Hammer, Carson, & Riley, 1999).

Dentro de la dilución en medio líquido se encuentra el método de microdilución en caldo; usado para obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI), definida como la menor concentración que mantiene o reduce la viabilidad del inóculo luego de 24 horas de contacto (Ramirez & Marin, 2009).

1.6. Actividad antioxidante

De acuerdo con (Granados, Santafé, & Yáñez, 2012), por la complejidad química de los aceites esenciales, el análisis de la actividad antioxidante puede dar resultados dispersos dependiendo del test empleado. Por lo tanto se debe considerar emplear más de un ensayo. Algunos de ellos pueden ser: ABTS, basado en la captación de los antioxidantes por el radical catión $ABTS^+$; y el DPPH, definido como la reducción del radical DPPH, en estos ensayos se emplean soluciones patrón de Trolox (Sánchez, 2002) (García, Leyva, Martínez, & Stashenko, 2007).

Según (Castañeda, Ramos, & Ibáñez, 2008) la actividad de DPPH se mide por espectrofotometría a 517 nm; a diferencia del ABTS que se mide a 734nm (Mesa, Rincon, Toro, Tamayo, & Blair, 2011).

CAPITULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

En la figura 3. Se indica detalladamente la metodología empleada en la presente investigación:

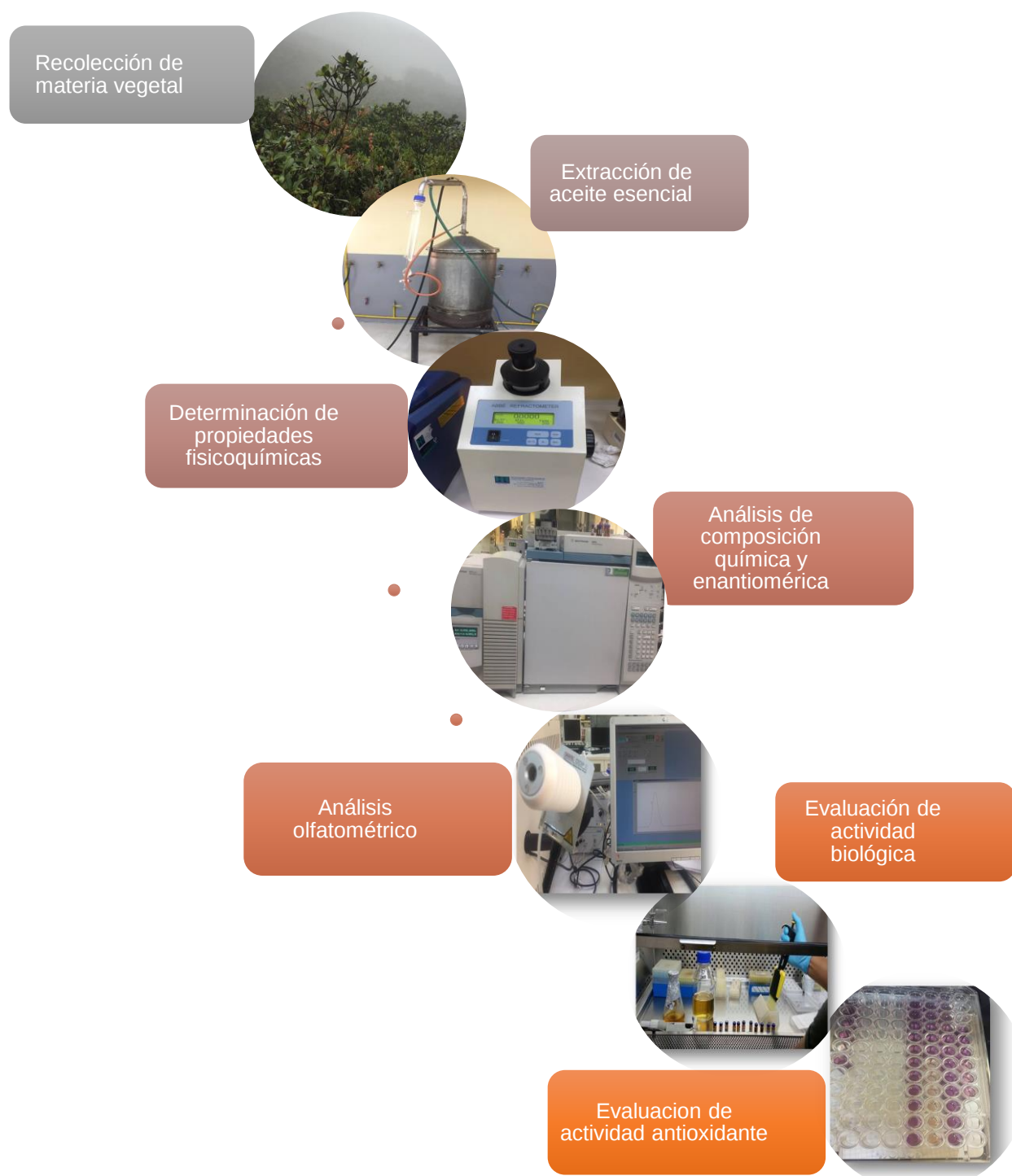


Figura 3. Esquema de desarrollo de la metodología

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

2.1. Recolección de materia vegetal

El material vegetal fué recolectado en tres ocasiones entre los meses Abril-Mayo del 2018, en el sector “El Tiro” límite entre las provincias de Loja y Zamora, con coordenadas: 70602E, 955887N, a una altitud de 2795 m.s.n.m (Figura 4). La especie fué identificada por el Dr. Nixon Cumbicus, se depositó un ejemplar en el herbario con código HUTPL13795. Para facilitar su transporte, se empacó el material en bolsas plásticas negras; se mantuvo en un lugar seco y aislado de la luz, finalmente, se separó y se seleccionó el material vegetal.

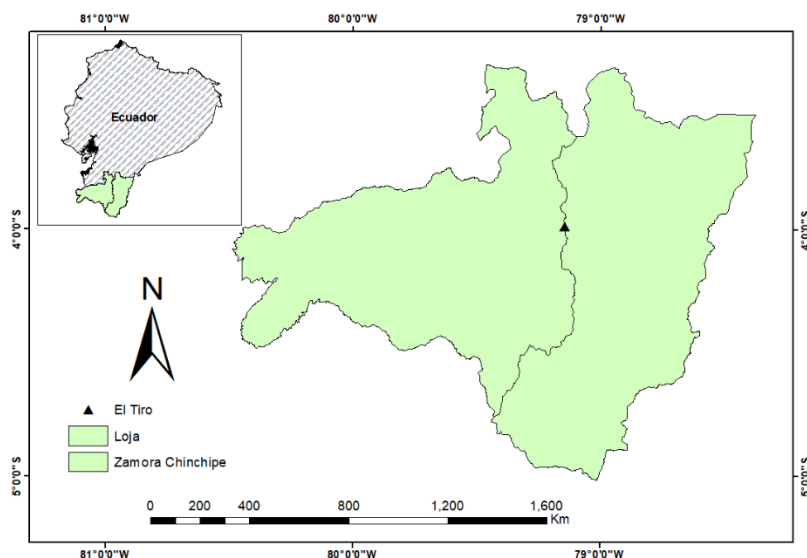


Figura 4. Área de recolección de la especie *H. purpurascens*

Fuente: (Benitez, 2018)

Elaboración: (Benitez, 2018)

2.2. Extracción del aceite esencial

A partir de 5 kilos de las hojas y tallos de la planta previamente recolectada, se obtuvo el aceite por arrastre de vapor, llevando a cabo tres destilaciones, cada una en un periodo de 4 horas. Se empleó el equipo de destilación tipo Clevenger (Figura 5); obteniendo los dos productos inmiscibles, agua y aceite, los cuales se separaron en un vaso florentino. Finalmente, se midió el volumen de aceite recogido en una probeta; y se calculó el porcentaje de rendimiento.



Figura 5. Equipo destilador de la UTPL

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

2.2.1. Tratamiento de las muestras

Para eliminar trazas de agua, producto de la destilación, se añadió sulfato de sodio anhídrido en el aceite obtenido, dejando reposar por media hora, luego se depositó en un envase ámbar, etiquetado con su respectivo código, especie vegetal, número de destilación y fecha (Figura 6); para posteriormente, ser almacenados en el laboratorio bajo refrigeración a 4°C, con la finalidad de conservar sus propiedades.



Figura 6. Envases etiquetados con la destilación respectiva

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

2.2.2. Determinación del rendimiento del aceite esencial

El rendimiento fué obtenido para cada una de las destilaciones, dado por la relación entre el volumen de aceite obtenido (Figura 7), y el peso de material vegetal utilizado al iniciar

el procedimiento (Anexo 1). Para concluir, se reportó un promedio de las tres destilaciones, y desviación estándar.

La fórmula empleada para el cálculo del rendimiento fué la siguiente:

$$\text{Rendimiento del aceite esencial (\%)} = \frac{\text{masa de aceite esencial obtenido en gramos}}{\text{masa de materia vegetal en gramos}} * 100$$



Figura 7. Imagen de aceite obtenido por destilación

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

2.3. Caracterización fisicoquímica del aceite esencial

2.3.1. Determinación de la densidad relativa

Se determinó la densidad de los aceites obtenidos en cada destilación, siguiendo el protocolo establecido por la norma ANFOR NFT75-111. Se inició con el peso del picnómetro vacío, seguido del picnómetro con agua destilada hasta llegar a 1mL. Finalmente, se pesó el aceite (Figura 8), y se aplicó la fórmula de densidad relativa (Anexo 2). Se realizó el cálculo de la media, y desviación estándar.

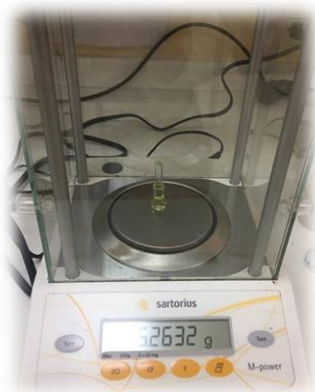


Figura 8. Picnómetro con muestra de aceite

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

2.3.2. Determinación del índice de refracción

Este análisis estuvo basado en la norma AFNOR NF T 75-112 25, el equipo utilizado fué un refractómetro ABBE ajustado a temperatura entre 20°C y 30°C. Conformado por un prisma, en donde se colocó una gota de aceite, se centró con ayuda del tornillo de ajuste, y se procedió a su lectura (Figura 9). A partir de las tres destilaciones, se realizó el cálculo (Anexo 3), se obtuvo la media y desviación estándar.



Figura 9. Refractómetro ABBE con aceite esencial

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

2.3.3. Determinación de rotación óptica específica

Se midió la capacidad del aceite para desviar la luz por medio del polarímetro automático modelo Hanon P 810. En este caso se empleó 1g de muestra de aceite diluida en 10ml de diclorometano, se colocó en la celda del polarímetro (Figura 10), se procedió con la lectura del ángulo de rotación, y se realizó el cálculo correspondiente (Anexo 4). De igual manera, este procedimiento se lo llevó a cabo para cada una de las destilaciones, obteniendo la media, y desviación estándar.



Figura 10. Celda con aceite esencial diluido en diclorometano

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

2.4. Análisis químico del aceite esencial

2.4.1. Preparación de las muestras

Las muestras se prepararon con 10ul de aceite esencial disuelto en 990ul de diclorometano. Además, se inyectó los estándares de hidrocarburos C_{10} - C_{25} (Chem Services) bajo las mismas condiciones del aceite.

2.4.2. Corrida cromatográfica en la columna DB5-MS acoplado a espectrómetro de masas (CG-EM)

Para el análisis cualitativo se utilizó el cromatógrafo de gases Agilent Technologies serie 6890N, con espectrómetro de masas Agilent serie 5973 Inert; constituido por un sistema de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, y un inyector automático Split/splitless serie 7683. Se empleó la columna apolar DB5-MS. Las condiciones de inyección para la corrida cromatográfica fueron las siguientes:

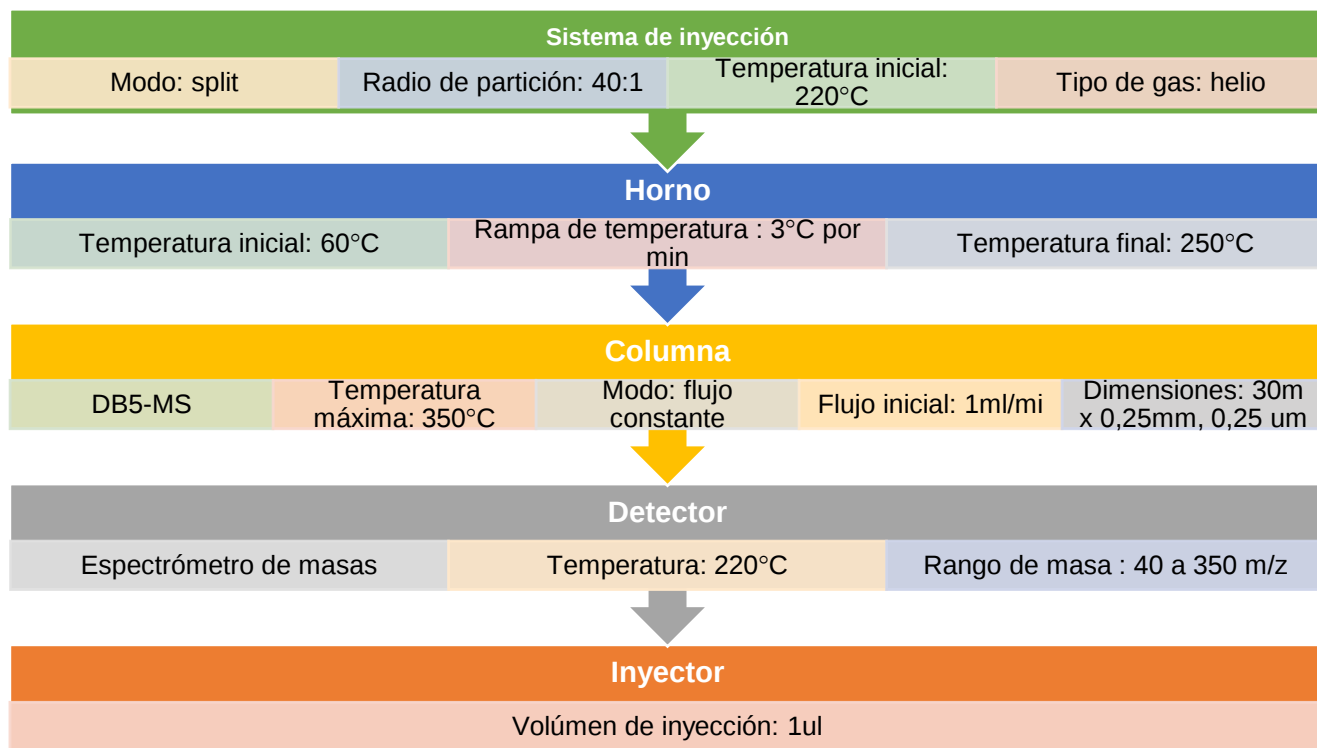


Figura 11. Condiciones operacionales para CG-EM con columna no polar DB5-MS

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

2.4.3. Corrida cromatográfica en columna DB5-MS acoplada al detector de ionización de llama (CG-FID)

Para el análisis cuantitativo, de igual forma se usó el Cromatógrafo de Gases Agilent Technologies serie 6890N acoplado a un detector de ionización de llama (FID) serie 7683. Se determinó la cantidad porcentual de cada compuesto químico comparando su área de pico con el cromatograma total, realizando la corrección del área.

Las condiciones en las que fueron inyectadas son las siguientes:

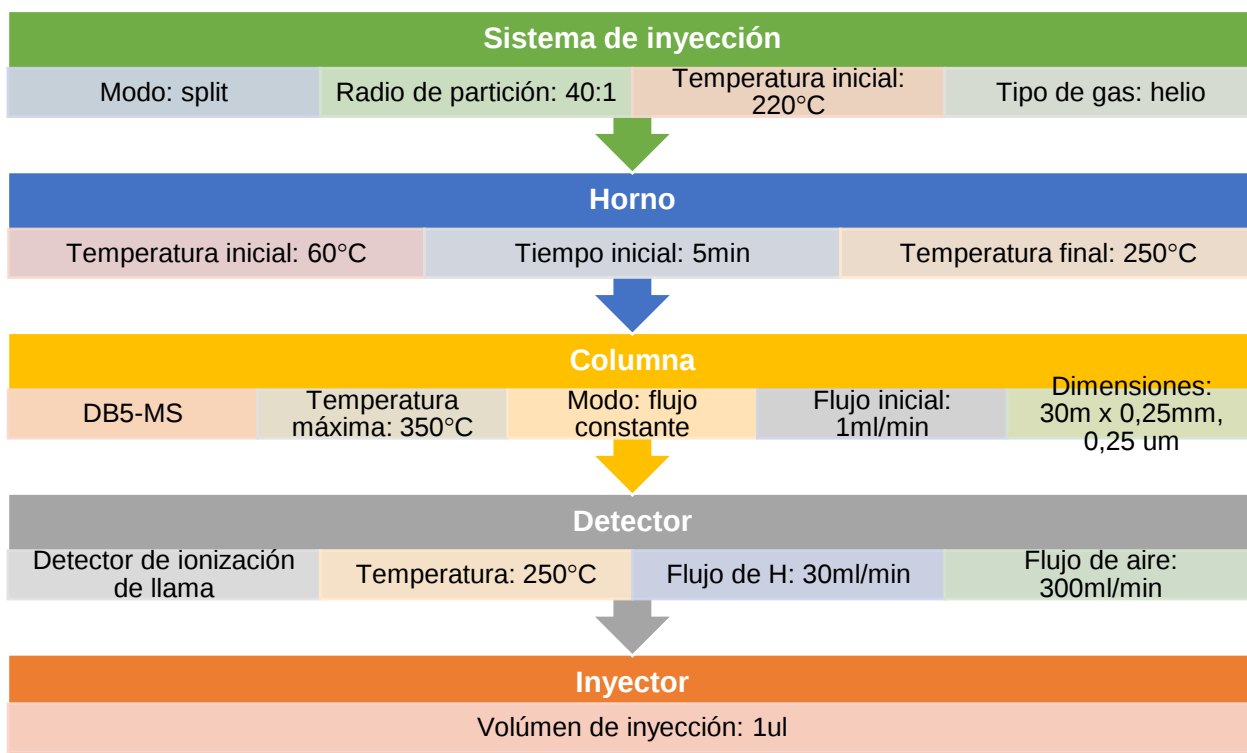


Figura 12. Condiciones operacionales para CG-FID con columna DB5-MS

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

2.4.4. Corrida cromatográfica en columna quiral acoplado a espectrómetro de masas

La composición enantiomérica se analizó mediante cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de gases, cuya fase estacionaria quiral empleada fue una columna MEGA-DEX DET-Beta (Diacetyl tertbutylsilyl-BETA-Cyclodextrin). Se comparó los tiempos de retención de los enantiómeros, obteniendo la distribución enantiomérica y el cálculo del exceso enantiomérico (Anexo 5).

Este análisis se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:

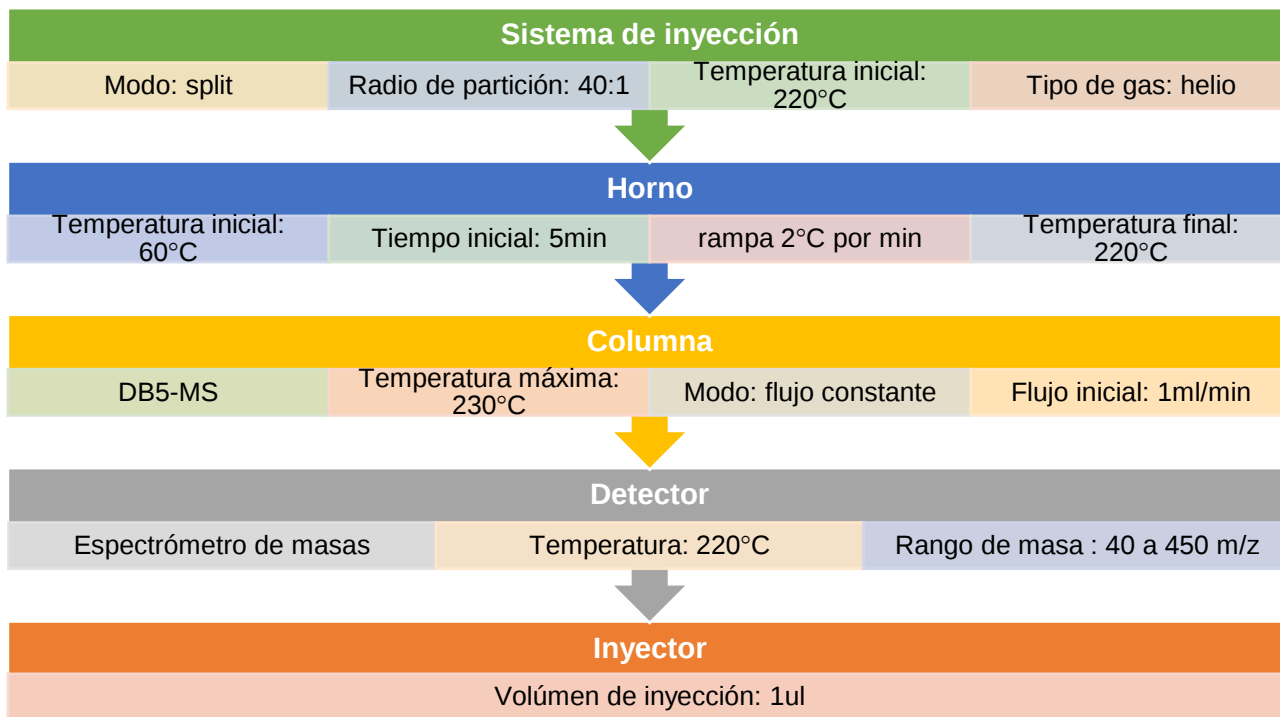


Figura 13. Condiciones operacionales para Cromatografía con columna quirral MEGA-DEX DET-Beta

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

2.4.5. Identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos

En el análisis cualitativo del aceite esencial de *Hedyosmum purpurascens* se graficó la curva de los alcanos con sus tiempos e índices de retención (Figura 14), se calculó el índice de retención lineal de cada uno de los compuestos, se procedió a comparar los espectros proporcionados por la base de datos WILEY 7n.1 con la bibliografía (Adams, 2017). Para el análisis cuantitativo se comparó el área de pico obtenido en Cromatografía de gases con el cromatograma total de FID, determinando el porcentaje de cada compuesto previamente identificado.

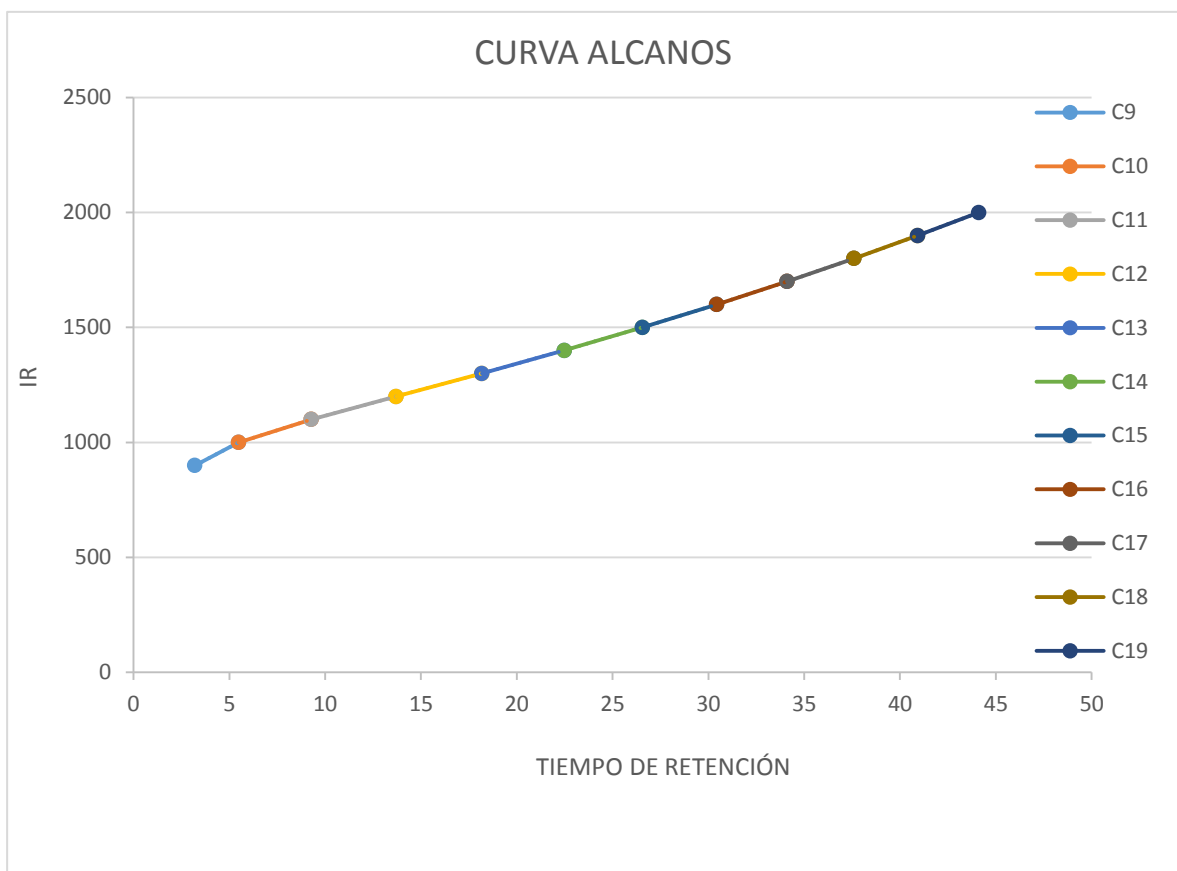


Figura 14. Curva de alcanos de la primera destilación

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

2.5. Análisis olfatométrico del aceite esencial por CG-O

El análisis CG-O del aceite esencial se realizó en el cromatógrafo de Gases Agilent Technologies serie 6890N acoplado a un puerto de detección olfativa de Gerstel OPD 3 (Figura 14), con una columna apolar DB5-MS, a las mismas condiciones de CG-EM.

2.5.1. Análisis de la dilución de extracto de aroma (AEDA)

En este análisis intervinieron dos panelistas, registrando la percepción de los distintos olores, acotando con una descripción del mismo. Los picos de olor que fueron detectados en la muestra una sola vez por un panelista no fueron considerados. Cada ejecución olfatométrica se dividió en dos mitades de aproximadamente 35 minutos, que a su vez fueron realizadas por cada panelista. El factor de dilución (FD) de los constituyentes aromáticos en los aceites esenciales se determinó mediante análisis de dilución de

extracto de aroma (AEDA) de una serie de diluciones (1, 2, 4, 8, 16, 32 veces). A partir de 90ul de aceite esencial con 210ul de ciclohexano es decir, 300ul/ml correspondiente a FD=1. Las alícuotas se analizaron mediante GC/O en la columna capilar DB-5MS. En base a los resultados de AEDA, solo fueron graficados en el aromagrama los picos que se percibieron más de una vez con su respectivo FD e índice de retención.

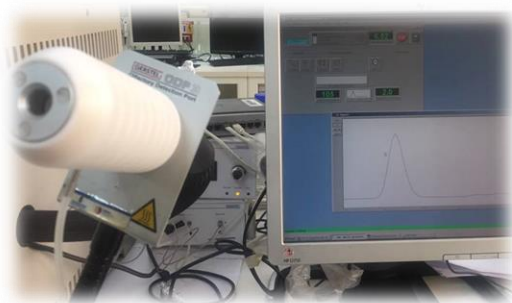


Figura 15. CG-O con columna DB5-MS

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

2.6. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Hedyosmum purpurascens*

Esta actividad fué evaluada por medio del método de microdilución en caldo utilizando volúmenes mínimos de muestra, y reportando los resultados en CMI (concentración mínima inhibitoria); conocido como la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibirá el crecimiento de un microorganismo luego de incubación (Andrews, 2001).

2.6.1. Microorganismos utilizados en la evaluación de la actividad antimicrobiana

Los microorganismos en estudio se obtuvieron de las colecciones de cultivos. Las cepas fueron las siguientes: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, y *Micrococcus luteus*.

2.6.2. Procedimiento

Este ensayo se realizó en una cabina de seguridad limpia y con material esterilizado como se muestra en la (Figura 15). Se usaron microplacas de 96 pocillos; en la primera fila se colocó 180 ul de caldo Mueller Hinton, y 100ul a los demás pocillos; en la misma fila se incorporó 20 ul de dilución de aceite a excepción de los últimos pocillos que contenían: el control de esterilización con 200ul de caldo, control negativo con 180ul de caldo más 20ul de DMSO, y el control positivo con 180ul de caldo más 20ul de Gentamicina (1mg/MI)

para todas las cepas menos para *E. faecalis* en la que se empleó Tetraciclina (5mg/MI) y para *C. albicans* que se usó (Ketoconazol). Se homogenizó pipeteando varias veces la solución de los pocillos de la primera fila, se tomó 100ul y se mezclaron con 100ul del pocillo siguiente, hasta tener 8 diluciones. Los 100ul restantes se colocaron en la última fila de la placa. Lo mismo se realizó para el control positivo, negativo y esterilidad. Se adicionó 100ul de suspensión de inóculo bacteriano en toda la microplaca, menos en los pocillos que contenían los controles. Así se completó el volumen de 200ul y se incubó a 37°C por 24h.

2.6.2.1. Lectura

Pasado el tiempo de incubación se examinó la caja, sobre todo el control de esterilidad, control positivo, y el control negativo, sobre todo para descartar contaminación, indicar que hubo crecimiento adecuado de las cepas, y evidenciar que no hubo crecimiento, respectivamente. De esta manera se determinará la CMI a la que funcionará el aceite como agente antimicrobiano.

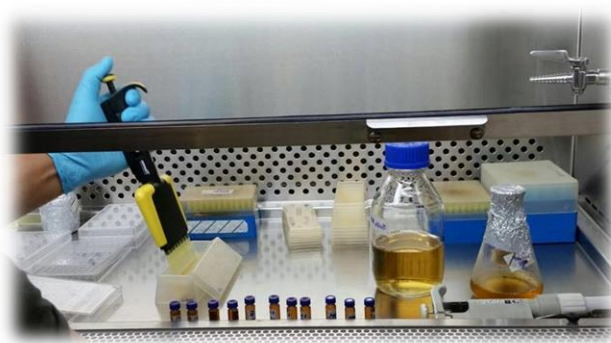


Figura 16. Material empleado en la actividad antimicrobiana

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

2.7. Actividad antioxidante

Para determinar la capacidad antioxidante del aceite esencial se siguieron los siguientes métodos:

2.7.1. Método DPPH

En este método a partir de una solución madre de 0,625mM con metanol, de esta se tomó un volumen aproximado de 4900 y 16100U uL de MeOH, alcanzando una absorbancia de

1.1 $\pm$ 0,02. Se continuó colocando 270 uL de la solución de trabajo con 30 uL de aceite esencial. Se preparó 270 uL de DPPH más 30 uL de MeOH como control del máximo de absorbancia; para el estándar se adicionó 270 uL de solución de trabajo con 30 uL del estándar de uM de Trolox; el blanco solo obtenía 300 uL de MeOH. La Curva de calibración se elaboró añadiendo 30 uL de cada estándar. Esto se llevó a cabo por triplicado, y se finalizó leyendo en el espectrofotómetro por una hora a 20°C, con longitud de onda de 715 nm.

2.7.2. Método ABTS

Para preparar una solución madre en este ensayo, se mezcló 7,4 mM de ABTS con 2,6 mM de persulfato de potasio en agua destilada, dejando en agitación a 190 r.p.m., evitando el contacto con la luz por un lapso de 16 horas, con el fin de que se dé la reacción, y se produzca el radical ABTS⁺. Se diluyó un volumen de 1050 uL de solución madre con 19950 uL de MeOH para preparar una solución de trabajo hasta llegar a una absorbancia de 1.1 $\pm$ 0,02; se colocó 270 uL de la solución de trabajo con 30 μ L de la muestra. Se incorporó 270 uL de ABTS con 30 uL de MeOH para el control máximo de la absorbancia de la solución de trabajo de ABTS; mientras que para el estándar se colocó 270 uL de solución de trabajo con 30 μ L del estándar de uM de Trolox, el blanco estuvo compuesto solo por 300 uL de MeOH. De igual manera se realizó por triplicado, y para finalizar se leyó en el lapso de una hora a una longitud de onda de 734nm a 20°C. Se reportó los resultados en uM equivalente de Trolox/gr de muestra seca.

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Rendimiento del aceite esencial

En la tabla 1 se presenta el resultado obtenido en la determinación del rendimiento del aceite esencial. Se puede apreciar que no existen diferencias significativas en el rendimiento del aceite esencial entre las muestras recolectadas. En la segunda destilación se obtuvo el mayor rendimiento correspondiente al (0,03%) a partir de 6800 g de material vegetal, mientras que en la primera y tercera destilación, se logró un rendimiento de (0,02%). Teniendo en cuenta que la muestra recolectada para la segunda destilación se encontró en estado de fructificación. Existen factores que influyen sobre el rendimiento del aceite esencial, entre los principales están: la localización geo climática, tipo de suelo, estado de desarrollo de la planta (antes, durante o después de floración) e incluso la hora o día de cosecha. Además, de planta en planta el rendimiento de un aceite varía desde 0,01% (Stashenko, 2009).

Según (Moreno, 2014) el promedio entre las tres destilaciones realizadas en la especie *Hedyosmum purpurascens* fué de 0,04%, lo que resultó ser aproximado al 0,02%, obtenido del aceite en estudio. Esto quiere decir que nuestra planta a pesar de que tuvo flores femeninas presentó un rendimiento cercano al de la bibliografía. Además, en otra investigación del aceite esencial de *Hedyosmum luteynii* se reportó un rendimiento de 0,07% (Torres et al., 2018).

Tabla 1. Rendimiento de muestras de aceite esencial

Destilación	Cantidad de material vegetal(g)	Cantidad de aceite obtenido(g)	Rendimiento (%)	$\bar{x}$	σ
HP 1	3830	0,76	0,02	0,02	± 0,01
HP 2	6800	1,96	0,03		
HP 3	6420	0,94	0,02		

HP: *Hedyosmum purpurascens*

$\bar{x}$: media aritmética

σ : desviación estándar

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

3.2. Determinación de Propiedades fisicoquímicas

3.2.1. Densidad relativa del aceite esencial

Según (Costa, 2003) la densidad de los aceites esenciales varía entre 0.84 g/cm^3 y 1.18 g/cm^3 , pero depende de la especie y su lugar de origen. El resultado de densidad obtenido en este estudio fué de $0,933 \text{ g/cm}^3$, encontrándose dentro del rango señalado en la literatura. En otro estudio de la misma especie, se obtuvo un promedio de $0,97 \text{ g/cm}^3$ (Moreno, 2014).

Tabla 2. Densidad relativa de muestras de aceite esencial

Destilación	Picnómetro vacío (g)	Picnómetro más agua(g)	Picnómetro más aceite (g)	Densidad (g/cm^3)	$\bar{x}$	σ
HP 1	4,198	5,334	5,262	0,936	0,933	$\pm 0,01$
HP 2	4,198	5,324	5,249	0,926		
HP 3	4,198	5,334	5,263	0,938		

HP: *Hedyosmum purpurascens*

$\bar{x}$: media aritmética

σ : desviación estándar

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

3.2.2. Índice de refracción de aceite esencial

Del aceite analizado en nuestra investigación, resultó un índice de refracción de 1,484. En un estudio del mismo aceite esencial se registró un valor de 1,480 (Moreno, 2014), observándose similitud en dichos valores.

Según (Albaladejo, 1999) el índice de refracción disminuye cuando aumenta la temperatura y es directamente proporcional a la densidad, Así como se observa en nuestros resultados reportados (Tabla 3).

Se usa el índice de refracción para identificar compuestos, determinar pureza y calidad, ya que la composición química del aceite puede influir sobre el índice de refracción (Delgado, Grande, Menjívar, & Sánchez, 2016).

Tabla 3. Índice de refracción de muestras de aceite esencial

Destilación	Índice de refacción ntD	Temperatura (°C)	ntD corregido	$\bar{x}$	σ
HP 1	1,491	20,2	1,491	1,484	±0,006
HP 2	1,481	20,1	1,481		
HP 3	1,481	20,8	1,481		

HP: *Hedyosmum purpurascens*

$\bar{x}$: media aritmética

σ : desviación estándar

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

3.2.3. Actividad óptica del aceite esencial

Si el compuesto es ópticamente activo, se conoce como dextrógiro (+), y la luz polarizada rota a favor de las manecillas del reloj, mientras que si va en dirección contraria, toma el nombre de levógiras (-) (Ortuño, 2006). En la tabla 4. Se indica el valor de +32, 90° de rotación óptica, señalando que la desviación de la luz va a la misma dirección de las manecillas del reloj.

Esta característica varía en cada especie. Por lo tanto, las diferencias de valores de rotación óptica entre muestras aromáticas probablemente estén relacionada a la presencia de componentes mayoritarios de cada una (Ochoa, Paredes, Bejarano, Dagnith, & Reinaldo, 2012).

Tabla 4. Actividad óptica de muestras de aceite esencial

Destilación	Temperatura	Angulo de rotación	Alfa d resultado	Alfa d corregido	$\bar{x}$	σ
HP 1	25.5	+3,31	32,95	32,95	+32,903	±0,049
HP 2	25.5	+3,30	32,85	32,85		
HP 3	25.6	+3,30	32,91	32,91		

HP: *Hedyosmum purpurascens*

$\bar{x}$: media aritmética

σ : desviación estándar

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

3.3. Composición química

El análisis del aceite esencial permitió la identificación de 67 compuestos, esto representa el 93,78% del aceite total. Compuesto en su mayoría por sesquiterpenos hidrocarbonados (47,14%), seguido de monoterpenos hidrocarbonados (17,54%), monoterpenos oxigenados (13,99%), y sesquiterpenos oxigenados (11,68%) (Tabla 5). Los compuestos más abundantes fueron: el Germacrene D (18,96%), Caryophyllene α -(Z)- (6,79%), Cadinene α - (5,67%), Linalool (5,41%), Cis ocimene (4,87%). De acuerdo al estudio de (Moreno, 2014) los compuestos mayoritarios en el aceite esencial de la misma especie fueron: α -phellandrene (11,53%), Germacrene D (9,16%), Cineole 1,8 (7,81%), Linalool (6,06%), Trans- β -ocimene (5,48%), donde se pudo observar diferencia en cuanto a nuestros resultados, debido a que nuestra planta tenía flores femeninas, mientras que en el estudio no especifican lo dioico.

En otros estudios, señalan resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio. Por ejemplo: El aceite esencial de la especie *H. costaricensis* presenta en su mayoría sesquiterpenos hidrocarbonados (63%) especialmente Germacrene-D (32%), además de sesquiterpenos oxigenados (7,2%), monoterpenos hidrocarbonados (4%) y monoterpenos oxigenados (1%) (Mundina et al., 2000). Asimismo, en el aceite esencial de *H. sprucei*, los sesquiterpenos representan el (88.57%) y monoterpenos el (10.10%) de todos los compuestos detectados e identificados; el (17,06%) del total son oxigenados (Guerrini et al., 2016), lo que es comparable con el aceite en estudio.

La variación en la composición en esta especie puede aclararse por el tipo de reproducción, ya que al ser plantas dioicas femeninas almacenan mayor energía y nutrientes para su reproducción a diferencia de las masculinas (Lago et al., 2008). Adicional a ello, las variaciones cualitativas se originan principalmente por variación genética, o en posibles influencias de tipo ecológico de acuerdo a la región en que crece la planta. Además, cada especie sufre modificaciones cuantitativas en los constituyentes principales por influencia del clima o del crecimiento de la planta (Ricciardi & Ricciardi, 2001).

El perfil cromatográfico se presenta a continuación en la figura 17

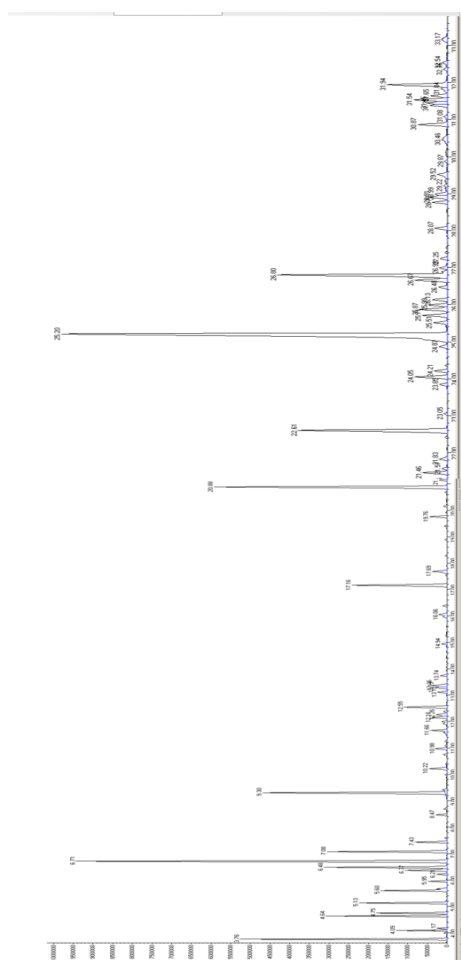


Tabla 5. Composición química determinado por CG-EM comparado con CG-FID del aceite esencial de *H. purpurascens*

Nº	Nombre de Compuesto	IR calculado	IR leído	MASAS %					FID %				
				HP1	HP2	HP3	$\bar{x}$	σ	HP1	HP2	HP3	$\bar{x}$	σ
1	Pinene < α ->	925	932	2,146	1,494	2,031	1,890	0,348	2,059	1,645	1,951	1,885	0,215
2	Camphene	939	946	0,567	0,367	0,634	0,523	0,139	0,559	0,437	0,652	0,549	0,108
3	Sabinene	963	969	1,584	0,770	2,185	1,513	0,710	1,531	0,854	2,116	1,500	0,632
4	Pinene < β ->	968	974	0,929	0,668	1,018	0,871	0,182	1,011	0,815	1,082	0,969	0,138
5	Myrcene	985	988	1,245	1,440	0,993	1,226	0,224	1,581	2,065	1,191	1,612	0,438
6	Phellandrene < α ->	1003	1002	1,008	2,373	1,646	1,676	0,683	0,859	2,259	1,365	1,494	0,709
7	Carene < δ 3->	1005	1008	0,151	1,642	0,469	0,754	0,786	0,160	1,845	0,497	0,834	0,892
8	Terpinene α	1012	1014	0,274	0,243	0,489	0,335	0,134	0,236	0,226	0,402	0,288	0,099
9	Cymene < α ->	1019	1022	0,165	0,336	0,315	0,272	0,093	0,141	0,290	0,219	0,217	0,075
10	Limonene	1023	1024	0,766	0,834	0,953	0,851	0,094	0,759	0,910	0,892	0,854	0,082
11	Cineole 1,8	1026	1026	1,947	1,537	5,381	2,955	2,111	1,831	1,636	5,255	2,907	2,035
12	Cis ocimene	1032	1032	5,933	3,987	3,634	4,518	1,238	6,204	4,684	3,732	4,873	1,247
13	Trans ocimene	1042	1044	1,886	1,294	1,235	1,471	0,360	2,074	1,560	1,213	1,616	0,433
14	Terpinene < γ ->	1051	1054	0,510	0,461	0,934	0,635	0,261	0,482	0,449	0,827	0,586	0,209
15	Terpinolene	1079	1086	0,194	0,320	0,343	0,286	0,080	0,200	0,281	0,310	0,264	0,057
16	Linalool	1101	1095	3,383	3,354	7,254	4,663	2,243	4,028	4,368	7,853	5,416	2,117
17	Camphenol <6->	1121	1111	0,359	0,280	0,642	0,427	0,190	0,360	0,254	0,540	0,385	0,145
18	Pinocarvone	1154	1160	0,318	-	0,657	0,487	0,240	0,399	0,264	0,540	0,401	0,138
19	Borneol	1165	1165	0,329	0,414	0,900	0,548	0,308	0,369	0,479	0,904	0,584	0,283
20	Terpinen-4- ol	1174	1174	0,853	0,714	2,145	1,237	0,789	0,857	0,722	2,131	1,237	0,777
21	Methyl chavicol	1192	1195	0,371	-	0,791	0,581	0,297	0,228	0,219	0,582	0,343	0,207
22	Cis ocimenone	1228	1226	-	-	0,297	0,297	-	0,160	0,178	0,331	0,223	0,094
23	Isoamyl hexanoate	1254	1246	0,277	-	0,367	0,322	0,064	0,278	0,234	0,482	0,331	0,132
24	Bornyl acetate	1281	1284	1,842	1,002	3,147	1,997	1,081	1,638	0,883	2,675	1,732	0,900
25	Sabynil acetate<trans->	1293	1289	0,324	-	0,917	0,621	0,419	0,477	0,144	0,986	0,536	0,424
26	Cubebene < α ->	1337	1348	0,328	0,313	-	0,320	0,011	0,296	0,268	0,181	0,248	0,060
27	Eugenol	1347	1356	-	-	0,303	0,303	-	0,179	0,100	0,402	0,227	0,157
28	Copaene < α ->	1363	1374	4,777	4,235	2,296	3,769	1,305	3,789	3,266	1,886	2,980	0,983
29	Cubebene < β ->	1376	1387	1,072	0,814	0,642	0,843	0,217	1,047	0,708	0,932	0,896	0,172
30	Elemene < β ->	1379	1389	0,231	0,317	0,646	0,398	0,219	0,261	0,251	0,236	0,249	0,013
31	Cyperene	1385	1398	0,406	2,359	0,416	1,060	1,125	0,332	1,756	0,189	0,759	0,866
32	Caryophyllene <(Z)->	1403	1408	7,196	6,435	7,793	7,141	0,681	6,935	5,942	7,495	6,791	0,786
33	Copaene < β ->	1434	1430	0,373	0,467		0,420	0,066	0,322	0,323	0,229	0,291	0,054

34	Humelene	1438	1438	1,515	1,434	1,448	1,466	0,044	1,445	1,253	1,258	1,319	0,109
35	Aromadendrene	1442	1439	0,601	1,943	0,554	1,032	0,789	0,582	1,540	0,463	0,862	0,590
36	Muurola-3,5-diene cis	1458	1448	0,452	0,626	0,380	0,486	0,126	0,389	0,471	0,322	0,394	0,075
37	Germacrene D	1467	1464	-	0,932	0,941	0,937	0,007	-	0,830	0,871	0,851	0,029
38	Germacrene D	1467	1464	25,479	20,779	16,460	20,906	4,511	21,793	17,527	15,022	18,114	3,423
39	Murolene <γ->	1474	1478	0,649	0,620	0,504	0,591	0,076	0,601	0,494	0,506	0,534	0,059
40	Bicyclogermacrene	1479	1489	1,191	1,220	1,119	1,176	0,052	1,147	1,061	1,088	1,099	0,044
41	Murolene <γ->	1483	1478	1,378	1,146		1,262	0,164	1,118	0,828	0,000	0,649	0,580
42	Amorphene <α->	1486	1483	0,877	0,807	1,465	1,050	0,361	0,795	0,666	0,600	0,687	0,099
43	Isodaucene	1490	1500	0,710	0,826	0,738	0,758	0,060	0,657	0,709	0,649	0,672	0,033
44	Amorphene <γ->	1498	1495	0,373	0,507	0,814	0,564	0,226	0,397	0,438	0,690	0,508	0,159
45	Amorphene <δ->	1503	1511	1,579	1,193	-	1,386	0,273	1,353	0,989	0,000	0,781	0,700
46	Cadinene <γ->	1506	1513	8,103	7,608	5,995	7,235	1,102	6,568	5,485	4,961	5,671	0,820
47	Eugenol acetate	1511	1521	0,397	0,402	0,570	0,457	0,099	0,635	0,213	0,254	0,367	0,233
48	Curcumene β	1518	1514	0,322	0,330	-	0,326	0,005	0,287	0,196	0,344	0,276	0,075
49	Ni	1539		-	0,766	1,266	1,016	0,353	0,584	0,518	0,515	0,539	0,039
50	Nerolidol <(E)->	1557	1561	0,648	1,009	1,442	1,033	0,398	0,928	1,112	1,244	1,095	0,159
51	Cadinene ether <cis->	1561	1552	0,890	1,124		1,007	0,165	0,911	0,945	1,303	1,053	0,217
52	Ni	1563	1570	0,567	0,972	0,813	0,784	0,204	0,815	1,033	0,797	0,882	0,131
53	Ni	1566		-	-	1,205	1,205	-	-	-	1,313	1,313	-
54	Spathulenol	1576	1577	0,520	0,419	-	0,469	0,072	0,481	0,235	0,250	0,322	0,138
55	Globulol	1601	1590	0,548	0,814	-	0,681	0,188	0,542	0,535	0,382	0,486	0,090
56	Ni	1608		-	0,221	-	0,221	-	-	0,028	0,089	0,059	0,043
57	Cubenol <1,10- di- epi->	1612	1618	1,355	1,248	1,050	1,218	0,155	1,256	1,064	0,883	1,068	0,187
58	Eudesmol <10-epi-γ>	1618	1622	-	0,393	1,206	0,800	0,575	0,197	0,258	0,940	0,465	0,412
59	Tau Cadinol	1626	1638	0,784	0,888	-	0,836	0,074	1,441	1,326	-	1,384	0,081
60	Tau Cadinol	1628	1638	0,856	1,072	0,658	0,862	0,207	1,403	1,357	1,090	1,283	0,169
61	Muurool epi <α->	1630	1640	1,601	1,893	0,687	1,394	0,629	1,413	2,568	1,090	1,690	0,777
62	Cubenol <1- epi->	1633	1627	0,837	0,914	1,133	0,961	0,154	0,757	0,603	0,987	0,782	0,193
63	Torreyol	1638	1644	0,390	0,498	0,701	0,530	0,158	0,339	0,278	1,152	0,590	0,488
64	Cadinol α	1641	1652	3,000	3,680	0,824	2,502	1,492	2,738	2,568	1,173	2,160	0,859
65	Eudesmol <7-epi-α->	1653	1662	0,211	1,153	2,390	1,251	1,093	0,249	0,900	0,792	0,647	0,349
66	Ni	1658		0,288	0,420	0,774	0,494	0,251	0,327	0,352	0,234	0,304	0,062
67	Mustakone	1675	1676	0,522	1,534	0,606	0,887	0,561	0,529	1,304	0,573	0,802	0,435
TOTAL			100						93,78				
NO IDENTIFICADO:		3,10											
IDENTIFICADO:		96,90											

MONOTERPENOS HIDROCARBONADOS:	17,54
MONOTERPENOS OXIGENADOS:	13,99
SESQUITERPENOS HIDROCARBONADOS:	47,14
SESQUITERPENOS OXIGENADOS:	11,68
OTROS:	0,33

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

3.4. Composición enantiomérica

En los últimos años la distribución enantiomérica de algunos enantiómeros ha sido beneficioso en la evaluación de calidad de aceites esenciales (Renaud, Charles, & Simon, 2001).

En esta especie se determinó el exceso enantiomérico y distribución enantiomérica de 8 pares de enantiómeros: siendo la mitad de ellos monoterpenos y los demás sesquiterpenos (Tabla 6). Presentando un mayor exceso enantiomérico el (+) (-) Linalool, (+) (-) Amorphene γ- y (+) (-) Copaene β- (Figura 18).

En un estudio enantiomérico del aceite esencial de la planta femenina *H. scabrum* detectaron 4 parejas enantioméricas: *S*(+) pinene β- 51,8%, *R*(-) pinene β- 48,2%; *S*(+) sabinene 7,7%, *R*(-) sabinene β- 92,3%; *S*(+) limonene 36,2%, *R*(-) limonene 63,8%; *S*(+) linalool 40,9%, y *R*(-) linalool 59,1% (Herrera et al., 2017); presentando similitud con algunos enantiómeros de nuestro estudio tales como: el (+)(-)pinene β- y (+)(-) linalool, pero con diferentes valores de distribución y exceso enantiomérico.

Ciertos enantiómeros podrían ser menos activos o incluso inodoros, como (*R*) - linalool, que tiene una poderosa nota floral, mientras que (*S*) -linalool es menos intenso, este es útil para tomar una decisión sobre el origen del aceite (natural o sintético) (Do, Hadji-Minaglou, Antoniotti, & Fernandez, 2015) (Renaud et al., 2001).

Esta combinación del análisis químico del aceite y el análisis quiral de los componentes ópticamente activos, son muy útiles para el control de calidad de nuestro aceite esencial.

Tabla 6. Enantiómeros del aceite esencial de *Hedysmum purpurascens*

TR	COMPUESTO	IR	Distribución enantiomérica (%)	Exceso enantiomérico (%)
11,07	(+)pinene <β->	962	32,98	34,03
11,5	(-)pinene <β->	970	67,02	
23,75	(+) Camphenol <6->	1178	47,67	4,65
23,96	(-) Camphenol <6->	1182	52,33	
24,8	(+) linalool	1196	4,82	90,36
25,46	(-) linalool	1207	95,18	
28,98	(-)terpinen-4- ol	1269	30,96	38,07
29,12	(+)terpinen-4- ol	1271	69,04	
38,048	(+) copaene <β->	1433	13,07	73,85
39,75	(-) copaene <β->	1465	86,93	
40,32	(+) amorphene <γ->	1476	94,88	89,76
40,72	(-) amorphene <γ->	1484	5,12	
42,32	(+) cubebol	1514	45,69	8,62
43,26	(-) cubebol	1533	54,31	
51,42	(+) muurolol< epi α->	1694	34,23	31,53
52,79	(-) muurolol< epi α->	1721	65,77	

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

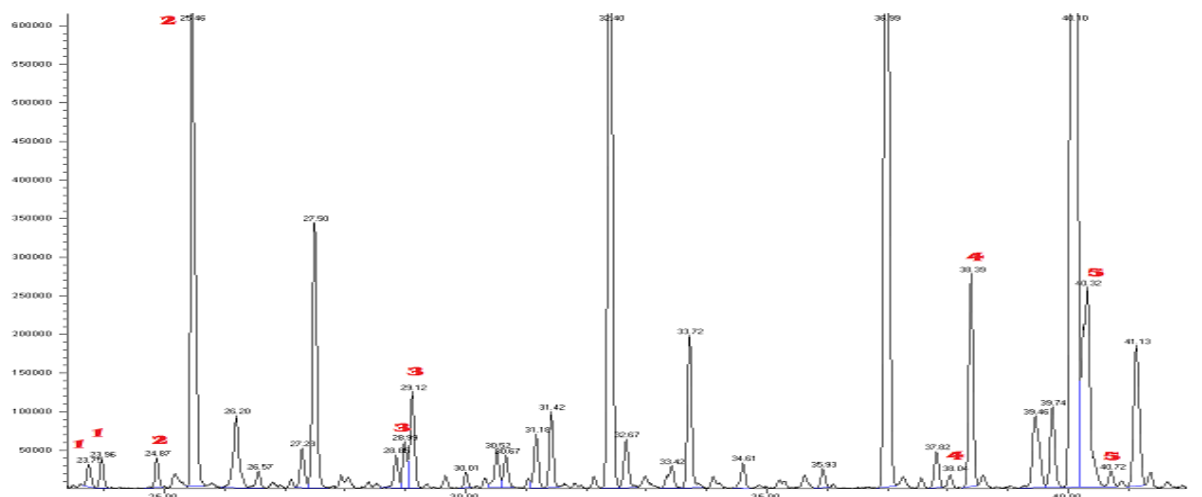


Figura 18. Exceso enantiomérico del aceite esencial de *H. purpurascens*: **1)** S (+) camphenol, R (-) camphenol **2)** S (+) linalool, R (-) linalool **3)** S (+) terpinen-4- ol, R (-) terpinen-4- ol **4)** S (+) copaene <β>, R (-) copaene <β-> **5)** S (+) amorphene <γ-> y R (-) amorphene <γ->.

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

3.5. Análisis olfatométrico

En la figura 19 se muestra superpuesto el espectro de masas y el aromagrama del aceite esencial. El aromagrama está representado por las barras de color rojo, indicando la captación del componente que corresponde al índice de retención del espectro de masas señalado con color negro. La intensidad de cada señal es proporcional a la dilución correspondiente al factor FD; por lo tanto, cuanto mayor es la intensidad de señal en el aromagrama, más importante es la contribución del compuesto correspondiente al perfil olfativo del aceite esencial (Ramírez et al., 2017).

La figura 20 expone el aromagrama AEDA del aceite esencial de *H. purpurascens*, con los 8 componentes más activos en el olor del aceite y sus respectivos FD. Así mismo, en la tabla 7 se demuestra los mismos compuestos con su respectiva descripción olfativa; siendo el más destacado el linalool, caracterizado por su olor cítrico. Éste componente también fué identificado en otra especie por medio del análisis olfatométrico presentando el mismo olor característico (Barbara D'Acampora et al., 2007).

Cabe mencionar que en el análisis AEDA, los compuestos más olorosos, no siempre corresponden a los porcentajes de los componentes mayoritarios en el aceite (Ramírez et al., 2017).

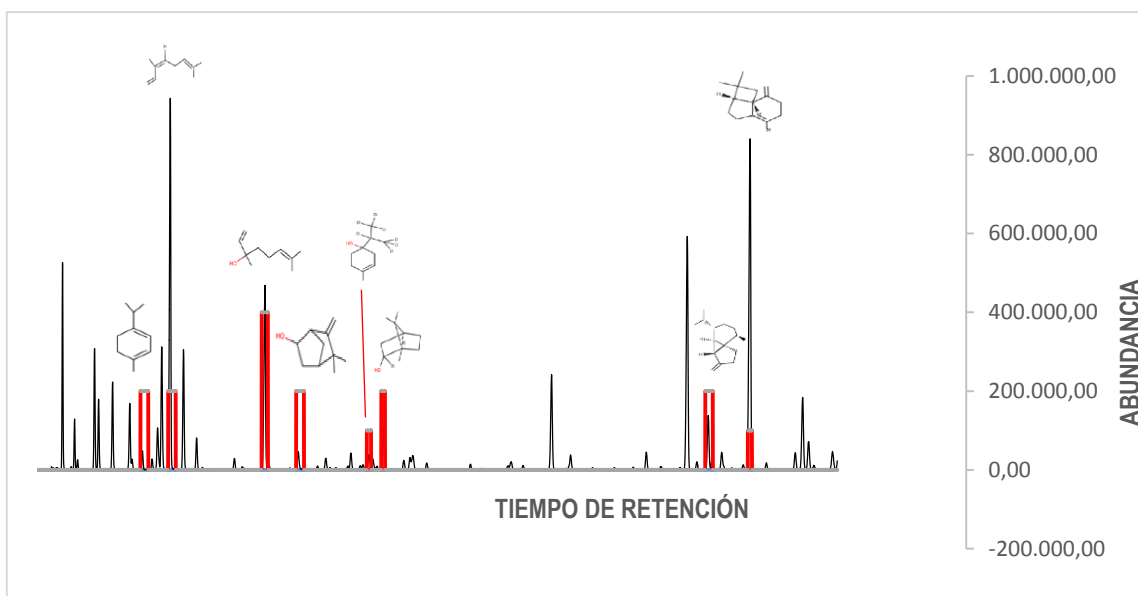


Figura 19. Superposición del espectro de masas con el Aromagrama del aceite.

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

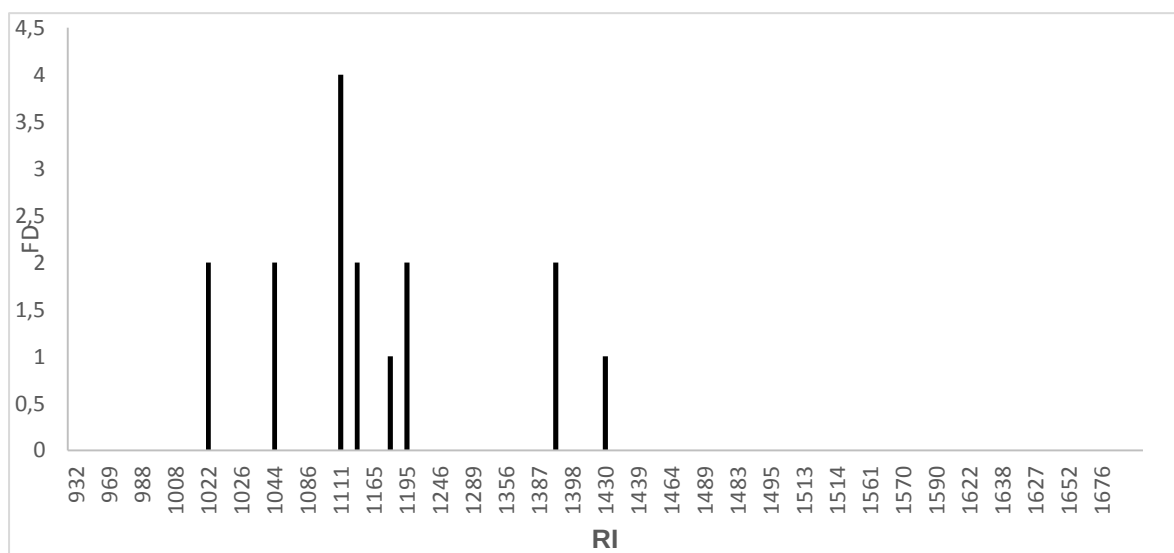


Figura 20. Aromagrama AEDA del aceite esencial de *H. purpurascens*.

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

Tabla 7. Compuestos activos en el olor del aceite esencial detectados por CG-O.

Descripción	FD (AEDA)	Compuesto	IR
leñoso	2	terpinene α	1014
herbáceo	2	cis ocimene	1032
cítrico	4	Linalool	1095
floral	2	Camphenol <6->	1111
floral	2	terpinen-4- ol	1174
terroso	1	Borneol	1165
cítrico	2	cubebene < β ->	1387
picante	1	caryophyllene <(Z)->	1408

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

3.6. Actividad antimicrobiana

Según (Van Vuuren & Holl, 2017) basándonos en los criterios publicados en los últimos años, se debe mencionar que el aceite analizado se muestra inactivo frente a los microorganismos Gram positivos, Gram negativos y hongos, ya que presento una CMI mayor a 1000ug/MI (Tabla 8).

En otra investigación del aceite esencial de *Hedyosmum purpurascens* resultó ser inactivo contra algunas de las cepas que también fueron usadas en nuestro estudio (Moreno, 2014). De igual forma, en otra especie conocida como *Hedyosmum racemosum* el aceite fué inactivo a altas concentraciones frente a bacterias y hongos (Chamba, 2015).

Asimismo, existen estudios dentro de la misma especie *Hedyosmum racemosum*, cuyo aceite esencial extraído de plantas femeninas y masculinas, resultó débil frente a *E. faecalis* 1000 y *K. pneumoniae* 500ug/MI (Ocampo, 2013).

Los factores geoclimáticos, y el tipo de suelo producen variabilidad, ya que pueden dar origen a diferentes quimiotipos de plantas con aceites esenciales de composición química y actividad biológica diferentes (Stashenko, 2009).

Tabla 8. CMI de las muestras de aceite esencial de *H. purpurascens*.

	Microorganismos	CMI (µg/mL)		
		HP1	HP2	HP3
Gram positivos	<i>Enterococcus faecalis</i>	>4000	>4000	>4000
	<i>Staphylococcus aureus</i>	>4000	>4000	>4000
	<i>Micrococcus luteus</i>	>4000	>4000	>4000
Gram negativos	<i>Escherichia coli</i>	>4000	>4000	>4000
Hongos	<i>Candida albicans</i>	>4000	>4000	>4000
Control positivo	Gentamicina (1mg/mL)	<i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>M. luteus</i> , <i>M. luteus</i>		
	Tetraciclina (5mg/mL)	<i>E. faecalis</i>		
	Ketoconazol	<i>C. albicans</i>		

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

3.7. Actividad antioxidante

De acuerdo con (Karadag, Ozcelik, & Saner, 2009), el potencial antioxidante está asociado a compuestos con capacidad de proteger un sistema biológico contra el gran daño de especies de oxígeno reactivas.

Para obtener una mayor visión de las propiedades antioxidantes del aceite esencial, el potencial antioxidante fué determinado por dos métodos espectrofotométricos distintos: DPPH, que funciona en la transferencia de electrones y ABTS, como captador de radicales libres.

3.7.1. Ensayo DPPH

En el ensayo DPPH, los valores del porcentaje de reducción para los dos aceites variaron de 89.15 ± 0.7 a 87.66 ± 0.55 , lo que indica una débil capacidad de captación de radical libre DPPH (Tabla 9).

Los aceites de *H. purpurascens* pudieron reducir el radical DPPH estable de coloración púrpura en DPPH-H con coloración amarillo (Figura 21).

Estos resultados fueron comparados con otros aceites esenciales de la especie *H. brasiliense*, los cuales también presentaron una baja actividad en el ensayo DPPH, con

SC 50 de 2516,18 a 3783,49 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (Murakami, Cordeiro, Scotti, Moreno, & Young, 2017). La capacidad antioxidante analizada por el método DPPH de los aceites esenciales no es muy alta como en los extractos y fracciones ricas en compuestos fenólicos (Brewer, 2011).

Tabla 9. Ensayo de DPPH en aceite esencial de *H. purpurascens*

DPPH		
ACEITE	$\mu\text{MET/g aceite}$	%Reducción DPPH
HP1	10.62 ± 0.05	89.15 ± 0.47
HP3	10.46 ± 0.06	87.66 ± 0.55

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

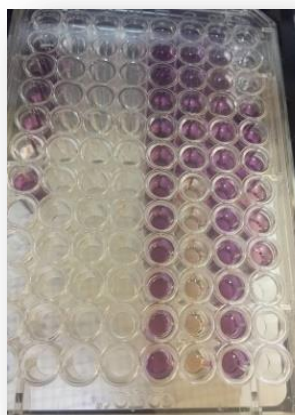


Figura 21. Muestras en Ensayo DPPH con cambio de coloración purpura a amarillo.

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

3.7.2. Ensayo ABTS

Por otro lado, nuestros resultados indicaron que los aceites esenciales de *H. purpurascens* fueron igualmente débiles en el ensayo de ABTS, presentando valores de

IC50 de $62,69 \pm 0,07 \text{ mg/mL}$ (Tabla 10), lo que indica su baja capacidad para captar radicales libres, presentando cambio de coloración (Figura 22).

En una prueba con 98 aceites esenciales puros, con actividad antioxidante; los fenoles, como timol y carvacrol, fueron los compuestos más activos, seguidos de los alcoholes mono y sesquiterpenos. Pero los hidrocarburos presentaron muy baja actividad antioxidante (Anthony, Deolu-Sobogun, & Saleh, 2012).

De esta manera, la baja actividad de eliminación de radicales observada para los aceites esenciales de *H. purpurascens* podría explicarse por las altas cantidades de hidrocarburos sesquiterpenos y monoterpénicos.

Tabla 10. Ensayo de ABTS en aceite esencial de *H. purpurascens*.

ABTS	
uMET/g aceite	SC50 (mg/mL)
$326,88 \pm 23,52$	$62,69 \pm 0,07$

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)



Figura 22. Muestras en ensayo ABTS con cambio de coloración azul a transparente.

Fuente: (Autora, 2018)

Elaboración: (Autora, 2018)

CONCLUSIONES

- Este es el primer reporte sobre la composición enantiomérica, análisis olfatométrico y actividad antioxidante de la especie *Hedyosmum purpurascens*.
- El aceite esencial obtenido se caracterizó por poseer un rendimiento de 0,02%, una densidad relativa de 0,93g/cm³, índice de refracción de 1,48 y rotación óptica de +32,90.
- Se identificó 67 compuestos, siendo los mayoritarios el Germacrene D (18,96%), Caryophyllene <(Z)-> (6,79%), Cadinene <γ-> (5,67%) Linalool (5,41%), y Cis ocimene (4,87%).
- Se determinó el exceso enantiomérico y distribución enantiomérica de 8 pares de enantiómeros: Linalool (90,36%), Amorphene <γ-> (89,76%), Copaene <β-> (73,85%), Terpinen-4-ol (38,07%), Pinene <β-> (34,03%), Muurolol<epi α-> (31,53%), Cubebol (8,62%), y Camphenol <6-> (4,65%).
- La actividad antioxidante de los aceites esenciales de *H. purpurascens* no fue efectiva para los ensayos, ya que resultó ser débil, lo que indica su poca capacidad de captar radicales libres.
- Frente a las bacterias y hongos en estudio, el aceite esencial fue inactivo, sin presentar actividad a altas concentraciones empleadas.
- La composición química, enantiomérica junto con su caracterización organoléptica y sensorial, además de sus propiedades antimicrobianas como antioxidantes son muy importantes para el control de calidad del aceite esencial, para que sea usado sobre todo de forma natural en productos de uso para la higiene personal, cosméticos y medicamentos.

RECOMENDACIONES

- Realizar el análisis químico y enantiomérico del aceite esencial de la planta con flores masculinas para evidenciar los cambios en su composición.
- Llevar a cabo el estudio de la parte volátil de la planta, ya que las especies del género *Hedyosmum* son empleadas en la medicina tradicional.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, R. (2017). *Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/mass Spectroscopy* (4.1). Allured publishing.
- Albaladejo, Q. (1999). *El aceite esencial de limón producido en España. Contribución a su evaluación por Organismos Internacionales*. Universidad de Murcia, Murcia.
- Almeida, E. (2000). *Culturas prehispánicas del Ecuador* (Chasquiñan). Quito.
- Andrews, J. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 5–16. 5
- Anthony, K., Deolu-Sobogun, S., & Saleh, M. (2012). Comprehensive assessment of antioxidant activity of essential oils. *Journal of Food Science*, 0(0), 1–5.
- Arroyave García, J., & Villa Flórez, L. (2011). *Estandarización de la técnica de cromatografía de gases con detector de ionización por llama para la determinación de BTEX en matrices acuosas*. Universidad Tecnológica de Pereira.
- Awouafack, M., Tane, P., Kuete, V., & Eloff, J. (2013). *Sesquiterpenes from the Medicinal Plants of Africa. Medicinal Plant Research in Africa: Pharmacology and Chemistry*. Dschang: Elsevier Inc.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475.
- Banthorpe, D., Charlwood, B., & Francis, M. (1971). The biosynthesis of monoterpenes. *Chemical Reviews*, 72(2), 115–155.
- Bascón, C. (2016). *La Cromatografía de Gases-Olfatometría como herramienta en la evaluación del aroma de los alimentos*. Universidad de Sevilla.
- Başer, K. ., & Buchbauer, G. (2010). *Handbook of Essential oils: Science, Technology, and Applications*. (K. . Başer & G. Buchbauer, Eds.), *Handbook of Essential Oils - Science, Technology and Applications*. New York: Taylor & Francis Group.
- Bekalo, T., Woodmatas, S., & Woldemariam, Z. (2009). An ethnobotanical study of medicinal plants used by local people in the lowlands of Konta Special Woreda, southern nations, nationalities and peoples regional state, Ethiopia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 5, 26.

- Bicchi, C., D'Amato, A., & Rubiolo, P. (1999). Cyclodextrin derivatives as chiral selectors for direct gas chromatographic separation of enantiomers in the essential oil, aroma and flavour fields. *Journal of Chromatography A*, 843(1–2), 99–121.
- Borges, R. (2001). *Análisis de los compuestos terpenicos C10 - C20 de las especies Lepechinia Conferta (Benth) y Lepechinia Salviaefolia (Kunth)*. Universidad de los Andes.
- Brewer, M. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), 27.
- Cao, C., Peng, Y., Shi, Q., & Xiao, P. (2008). Chemical constituents and bioactivities of plants of chloranthaceae. *Chemistry and Biodiversity*, 5(2), 219–238.
- Castañeda, C., Ramos, L., & Ibáñez, V. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Horizonte Médico*, 8(1), 56–72.
- Chamba, D. (2015). Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de individuos con flores masculinas de la especie *Hedyosmum racemosum* (Ruiz & Pav.) G.Don de la provincia de Loja. UTPL.
- Costa, D. (2003). Antioxidantes naturales en alimentación animal. Conferencia inaugural del curso académico 2003-2004. In *Real Academia de Ciencias Veterinarias*. Madrid.
- D'Acampora, B., Casilli, A., Dugo, P., Dugo, G., & Mondello, L. (2007). Odour fingerprint acquisition by means of comprehensive two-dimensional gas chromatography-olfactometry and comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1141(2), 279–286.
- D'Acampora, B., Lo Presti, M., Soares, L., Dugo, P., Dugo, G., & Mondello, L. (2006). Evaluation of leaf-derived extracts as an environmentally sustainable source of essential oils by using gas chromatography-mass spectrometry and enantioselective gas chromatography-olfactometry. *Analytical Chemistry*, 78(3), 883–890.
- Delgado, J., Grande, C., Menjívar, J., & Sánchez, S. (2016). Relación del índice de refracción y la concentración de timol en aceites esenciales de *Lippia origanoides* Kunth, 32(2), 127–133.

- Do, T., Hadji-Minaglou, F., Antoniotti, S., & Fernandez, X. (2015). Authenticity of essential oils. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 66 (December), 146–157.
- Eikani, M., Golmohammad, F., & Rowshanzamir, S. (2007). Subcritical water extraction of essential oils from coriander seeds (*Coriandrum sativum* L.). *Journal of Food Engineering*, 80(2), 735–740.
- França, I. de, Souza, J. de, Baptista, R., & Britto, V. de S. (2008). Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. *Revista Brasileira de Enfermagem*, 61(2), 201–208.
- García, A., Leyva, M., Martínez, J., & Stashenko, E. (2007). Determinación de la composición química y actividad antioxidante in vitro del aceite esencial de *Piper auritum* kunth (Piperaceae) difundida en la costa colombiana. *Scientia et Technica*, 1(33), 439–442.
- Granados, C., Santafé, G., & Yáñez, X. (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Bistua: Revista de La Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1), 12–23.
- Guerrini, A., Sacchetti, G., Grandini, A., Spagnoletti, A., Asanza, M., & Scalvenzi, L. (2016). Cytotoxic Effect and TLC Bioautography-Guided Approach to Detect Health Properties of Amazonian *Hedyosmum sprucei* Essential Oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016.
- Gutiérrez, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter Del Instituto de Investigacion Textil y de Cooperacion Industrial*, (122), 35–41.
- Hammer, K., Carson, C., & Riley, T. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985–990.
- Harner, T., Wiberg, K., & Norstrom, R. (2000). Enantiomer fractions are preferred to enantiomer ratios for describing chiral signatures in environmental analysis. *Environmental Science and Technology*, 34(1), 218–220.
- Herrera, C., Morocho, V., Vidari, G., Bicchi, C., & Gilardoni, G. (2017). Phytochemical Investigation of male and female *Hedyosmum scrabum* (Ruiz & Pav.) Solms leaves from Ecuador, 12, 16.

- Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2(1), 60.
- Kirchner, K., Wisniewski, A., Cruz, A. B., Biavatti, M. W., & Netz, D. J. A. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae, essential oil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20(5), 692–699.
- Lago, J., Romoff, P., Fávero, O., Souza, F., Soares, M., Baraldi, P., & Corrêa, A. (2008). Chemical composition of male and female *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) essential oils. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36, 4.
- León, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa, C. U., Navarrete, H., Pitman, N. (2011). *Libro rojo de las plantas endémicas del ecuador*.
- López, N., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*, 32(3), 81–91.
- Ludlow, B. (1981). *Flora de Veracruz* (Vol. 48). Xalapa.
- Macías, F., Molinillo, J., Valera, R., & Galindo, J. (2007). Review Allelopathy – a natural alternative for weed control. *Pest Management Science*, 63, 327–348.
- Martinez, J. (2005). *Desinfeccion*. Medellin.
- Merfort, I. (2002). Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. *Journal of Chromatography A*, 967, 115–130.
- Mesa, A., Rincon, D., Toro, J., Tamayo, A., & Blair, S. (2011). Actividad antioxidante de *Piper piedecuestanum* Trel. & Yunck. y *Piper subpedale* Trel. & Yunck. *Revista Latinoamericana de Química*, 39(3), 91–99.
- Michlmayr, H., Nauer, S., Brandes, W., Schümann, C., Kulbe, K., Del Hierro, A., & Eder, R. (2012). Release of wine monoterpenes from natural precursors by glycosidases from *Oenococcus oeni*. *Food Chemistry*, 135(1), 80–87.
- Mohammad, A., Ki-Hyun, K., & Jeong, A. (2014). Monoterpenes released from fruit, plant, and vegetable systems. *Sensors (Switzerland)*, 14(10), 18286–18301.
- Moreno, V. (2014). *Determinación fisicoquímica y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de Hedyosmum purpurascens* (Chloranthaceae) de la provincia de Loja. UTPL.

- Mundina, M., Vila, R., Tomi, F., Cicció, J. F., Ibañez, C., Adzet, T., Cañigüeral, S. (2000). Composition of the essential oils from leaves and fruits of three *Hedyosmum* species from Costa Rica. *Flavour and Fragrance Journal*, 15(3), 201–205.
- Murakami, C., Cordeiro, I., Scotti, M., Moreno, P., & Young, M. (2017). Chemical Composition, Antifungal and Antioxidant Activities of *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. (Chloranthaceae) Essential Oils. *Medicines*, 4(3), 13.
- Ocampo, M. (2013). *Determinación de las propiedades físicas, químicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de Hedyosmum racemosum* (Ruiz & Pav.) G. Don de la familia Chloranthaceae de la provincia de Zamora Chinchipe. UTPL.
- Ochoa, K., Paredes, L., Bejarano, D., Dagnith, L., & Reinaldo, J. (2012). Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd (Wiskataya). *Scientia Agropecuaria*, 3, 291–302.
- Ortuño, M. (2006). *Manual practico de aceites esenciales, aromas y perfumes* (1era ed.). España.
- Özek, T., Tabanca, N., Demirci, F., Wedge, D., & Can Başer, K. (2010). Enantiomeric distribution of some linalool containing essential oils and their biological activities. *Records of Natural Products*, 4(4), 180–192.
- Ramírez, J., Gilardoni, G., Jacome, M., Montesinos, J., Rodolfi, M., Guglielminetti, M., ... Vidari, G. (2017). Chemical composition, enantiomeric analysis, AEDA sensorial evaluation and antifungal activity of the essential oil from the Ecuadorian plant *Lepechinia mutica* Benth (Lamiaceae). *ARPJ Journal of Engineering and Applied Sciences*, 18.
- Ramirez, L., & Marin, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, (42), 263–268.
- Renaud, E., Charles, D., & Simon, J. (2001). Essential oil quantity and composition from 10 cultivars of organically grown lavender and lavandin. *Journal of Essential Oil Research*, 13(4), 6.
- Ricciardi, G., & Ricciardi, A. (2001). Efecto de las Variaciones Estacionales sobre la Composición Química del Aceite Esencial de Plantas de “ Salvia morada ” de Sáenz Peña (Chaco). UNNE.

- Rios, M., Koziol, M. J., Borgtoft, H., & Granda, G. (2007). *Plantas útiles del Ecuador aplicaciones, retos y perspectivas*. Quito.
- Rossi, L. (2002). Chloranthaceae. *Flora Fanerogâmica Do Estado de São Paulo*, 2, 83–84.
- Saavedra, M. (2016). *Extracción y caracterización del aceite esencial de las semillas de Tamarindo (Tamarindus indica)*, Lambayeque – 2014. Universidad Señor de Sipán.
- Sánchez, C. (2002). Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121–137.
- Skoog, D., & Holler, J. (2016). *Principles of Instrumental Analysis* (7ma ed.). Boston, USA.
- Stashenko, E. (2009). *Aceites Esenciales. División de Publicaciones UIS* (Primera Ed). Bucaramanga.
- Thormar, H. (2010). Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents. *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents* (First Edit). Nueva Delhi.
- Todzia, C. (1998). Cloranthaceae: *Hedyosmum*. *The New York Botanical Garden* (Vol. 48). <https://doi.org/10.2307/2805360>
- Torre, L. De, & Macía, M. J. (2008). La etnobotánica en el Ecuador. *Enciclopedia de Las Plantas Útiles Del Ecuador*, (January), 13–27.
- Torres, S., Tovar, M., García, V., Lucena, M., Araujo Baptista, L., & Baptista, L. (2018). Composición química del aceite esencial de las hojas de *Hedyosmum luteynii* Todzia (Chloranthaceae). *Revista Peruana de Biología*, 25(2), 6.
- Toscano, J. (2006). Uso tradicional de plantas medicinales en la vereda san isidro, municipio de san josé de pare-boyacá: un estudio preliminar usando técnicas cuantitativas. *Acta Biológica Colombiana*, 11(2), 137–146.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Grazia, M. (2005). Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), 2474–2478.
- Ulloa, C., & Jorgensen, P. (1993). *Arboles y arbustos de los Andes del Ecuador*. Quito.
- USP. (2009). *Farmacopea de los Estados Unidos de America- Formulario Nacional*. (USP NF. Co).

- Van Ruth, S. (2001). Methods for gas chromatography-olfactometry: A review. *Biomolecular Engineering*, 17(4–5), 121–128.
- Van Vuuren, S., & Holl, D. (2017). Antimicrobial natural product research: A review from a South African perspective for the years 2009–2016. *Journal of Ethnopharmacology*, 208, 17.
- Vilela, A., González, L., & Ravetta, D. (2011). Metabolismo secundario de plantas leñosas de zonas áridas: Mecanismos de producción, funciones y posibilidades de aprovechamiento. *Ecologia Austral*, 21(3), 317–327.
- Zekaria, D. (2007). Los aceites esenciales, una alternativa a los antimicrobianos. *Laboratorios Calier*.
- Zeković, Z., Adamović, D., Četković, G., Radojković, M., & Vidovića, S. (2011). Essential oil and extract of coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Acta Periodica Technologica*, 42, 281–288.

ANEXOS

Anexo 1. Rendimiento

El cálculo del rendimiento del aceite esencial resulto de la relación con el volumen de aceite obtenido con el peso de materia vegetal. Se empleó la siguiente fórmula:

$$R (\%) = \frac{V \text{ (mL)}}{P \text{ (g)}} * 100$$

Donde:

P: peso de materia vegetal recolectada representado en gramos.

V: volumen de aceite esencial expresado en mililitros.

R: Rendimiento del aceite expresado en porcentaje.

Anexo 2. Densidad Relativa

La densidad relativa a 20°C de un aceite esencial se denota como la masa de un aceite sobre la masa del agua destilada a igual temperatura. El cálculo de la densidad se detalla en la fórmula:

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

Donde:

d_{20}^{20} : Densidad relativa a 20°C.

m_0 : masa del picnómetro vacío expresado en gramos.

m_1 : masa del picnómetro con agua representado en gramos.

m_2 : masa en gramos del picnómetro lleno con aceite esencial expresado en gramos.

Anexo 3. Índice de refracción

El índice de refracción resulta del seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción de un rayo luminoso de longitud de onda determinada, que transita por el aire al aceite permaneciendo a temperatura constante.

La fórmula empleada en la determinación del índice de refracción es la que se indica a continuación:

$$nt_D = nt_D + 0,004(t' - t)$$

Donde:

nt_D : índice de refracción a 20°C.

nt_D equipo: valor de lectura a 20°C

0,0004: factor de corrección

t' : temperatura en la que se ejecutó la lectura

t : 20°C

Anexo 4. Rotación óptica

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{100 * \alpha}{l * c}$$

$$[\alpha]_{\lambda}^{25,5} = \frac{100 * 3,307}{1 * c}$$

$$[\alpha]_{\lambda}^{25,5} = 32,90^{\circ}$$

Donde:

$[\alpha]_{\lambda}^T$: rotación específica

T: temperatura

λ : longitud de onda de luz

α : ángulo de rotación

l: longitud del tubo del polarímetro

c: concentración de la disolución

Anexo 5. Exceso enantiomérico

Para este cálculo se relaciona la distribución enantiomérica que resultó con anterioridad por medio de la fórmula a continuación:

$$ee(\%) = \frac{[R - S]}{[R + S]} * 100$$

Donde:

ee(%): exceso enantiomérico

R: enantiómero (+)

S: enantiómero (-)