



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* (Ruiz & Pav.) G. Don de la familia Chloranthaceae de la provincia de Loja, a partir de individuos con flores femeninas

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTORA: Correa Conza, Magdaly Juliana

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

LOJA - ECUADOR

2014

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Ph.D.

Benito Eduardo Valarezo Valdez

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

CERTIFICA:

El presente trabajo de fin de titulación: **“Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* (Ruiz & Pav.) G. Don de la familia Chloranthaceae de la provincia de Loja, a partir de individuos con flores femeninas”** realizado por Correa Conza Magdaly Juliana, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Agosto de 2014

f.....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CÉSION DE DERECHO

“Yo Correa Conza Magdaly Juliana declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: **“Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* (Ruiz & Pav.) G. Don de la familia Chloranthaceae de la provincia de Loja, a partir de individuos con flores femeninas”**, 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. 67 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.....

Correa Conza Magdaly Juliana

1104329691

DEDICATORIA

La presente investigación dedico primeramente a Dios y a la virgencita de Guadalupe por estar siempre a mi lado, por darme valor y brindarme la fortaleza que tanto necesito, por haberme regalado una familia tan maravillosa.

A mi padre Teobaldo Correa por ser una de las personas más responsables y luchadoras que he conocido, simplemente eres mi héroe, A mi mami Piedad Conza porque a lado de todo gran hombre hay una gran mujer, por su inmenso amor, su incondicionalidad y sus sabios concejos. A mis hermanos María y Marcelo que adoro tanto, porque a pesar de nuestras diferencias siempre creyeron en mí.

A mis sobrinos María, Andy y Erick por ser uno de los tesoros más grandes que Dios me regalo, son mi inspiración para seguir adelante, porque en su sonrisa puedo ver un pedacito de cielo, los amo mis pequeños.

Magdaly Correa

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi eterno agradecimiento a Dios y la virgen de Guadalupe por acompañarme todos los días durante este largo trayecto de mi vida, por haber confortado mi corazón cuando tuve que pasar situaciones muy dolorosas, ahora gracias a ellos culmino una etapa más en mi vida para dar inicio a otra.

A mis queridos padres Teobaldo y Piedad ambos trabajadores incansables, que a pesar de las adversidades siempre comparten una sonrisa y una luz de esperanza, gracias por el apoyo incondicional, son mi inspiración para seguir adelante, de igual forma mil gracias porque siempre me dejaron ser libre y me permitieron tomar mis propias decisiones porque a pesar de mis locuras me supieron querer y reprender cuando estaba equivocada, enseñándome a superar las dificultades, me siento tan orgullosa de tener unos padres tan maravillosos, mil gracias a los dos por darme la oportunidad de culminar mi carrera.

A mi hermana María, hemos compartido secretos y aventuras que solo se puede vivir entre hermanas, de carácter fuerte pero que me ha demostrado un amor inigualable, a mi hermanito Marcelo el más alegre de las dos, siempre tratando de hacer lo mejor para nosotras, y aunque ahora te encuentres lejos a través de tus palabras me has alentado constantemente para seguir adelante, A los dos gracias por haberme dado las fuerzas y el valor cuando sentía decaer.

A mi tía Marilú por estar siempre apoyándome y dándome fuerzas para seguir luchando, por todos los momentos compartidos y por compartir. Que haría sin ti, definitivamente eres mi hada madrina, por todo eso mil gracias.

A mi amiga Fernanda por las locuras compartidas por los ánimos que me ha transmitido durante todo este tiempo, por haber estado conmigo en situaciones difíciles, gracias por todo te quiero niña.

A mi director de Tesis, Ing. Eduardo Valarezo por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a sus conocimientos y experiencia en un ambiente de confianza y sobre todo por haber confiado en mí para llevar a cabo la realización de este proyecto. A todo el personal del Instituto de Química Aplicada por haberme brindarme todos los medios para realizar esta investigación.

Magdaly Correa

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARATULA	I
CERTIFICACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VI
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO	5
1.1. <i>Plantas medicinales</i>	6
1.2. <i>Flora Ecuatoriana</i>	6
1.3. <i>La Familia Chloranthaceae</i>	7
1.3.1. <i>El género Hedyosmum</i>	7
1.3.2. <i>Hedyosmum racemosum</i>	8
1.3.3. <i>Taxonomía de Hedyosmum racemosum</i>	9
1.4. <i>Aceites esenciales</i>	9
1.4.1. <i>Generalidades</i>	9
1.4.2. <i>Clasificación</i>	10
1.4.3. <i>Extracción</i>	11
1.4.4. <i>Caracterización química de los aceites esenciales</i>	12
1.4.5. <i>Propiedades</i>	13
1.4.6. <i>Usos y aplicaciones</i>	13
1.5. <i>Actividad Biológica</i>	14
1.5.1. <i>Hongos</i>	14
1.5.2. <i>Bacterias</i>	15
1.5.2.1. <i>Bacterias Gram positivas</i>	15
1.5.2.2. <i>Bacterias Gram negativas</i>	16
1.5.3. <i>Enfermedades microbianas</i>	17
1.6. <i>Actividad antioxidante</i>	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1. <i>Recolección del material vegetal</i>	21
2.1.1. <i>Determinación de la humedad</i>	22
2.2. <i>Extracción del aceite esencial</i>	23
2.2.1. <i>Determinación del rendimiento</i>	24

2.3. Determinación de las propiedades Físicas.....	24
2.3.1. Densidad relativa	24
2.3.2. Índice de Refracción	25
2.4. Determinación de la composición química del aceite esencial	26
2.4.1. Cromatografía de gases.....	27
2.4.2. Análisis del aceite esencial por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas y al detector de ionización en llama.....	28
2.4.3. Preparación de la muestra.....	29
2.4.4. Corrida cromatográfica en la columna DB-5ms acoplado a espectrometría de masas.....	30
2.4.5. Corrida cromatográfica en la columna HP-INNOWAX acoplado a espectrometría de masas.....	31
2.4.6. Identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos químicos del aceite esencial.....	32
2.4.7. Corrida cromatográfica en la columna DB-5ms acoplado al detector de ionización en llama (FID).....	33
2.4.8. Corrida cromatográfica en la columna HP-INNOWAX acoplado al detector de ionización en llama(FID).....	35
2.4.9. Identificación cuantitativa de los compuestos por CG/FID.....	36
2.5. Evaluación de la actividad biológica.....	36
2.5.1. Cepas bacterianas y fúngicas.....	36
2.5.2. Actividad antibacteriana.....	37
2.5.2.1. Método de microdilución en caldo.....	37
2.5.2.1.1. Preparación de la muestra	38
2.5.2.1.2. Preparación del cultivo microbiano “Cultivo overnight”.....	38
2.5.2.1.3. Preparación de la suspensión del inóculo bacteriano.....	39
2.5.2.1.4. Procedimiento.....	39
2.5.3. Actividad antifúngica	42
2.5.3.1. Preparación de la muestra	42
2.5.3.2. Preparación de la suspensión de los inóculos fúngicos.....	42
2.5.3.3. Procedimiento.....	43
2.5.4. Lectura de las placas de C.M.I. antibacteriana y antifúngica e interpretación de los resultados.....	43
2.6. Evaluación de la actividad antioxidante	44
2.6.1. Preparación de la muestra	44
2.6.2. Método de ABTS	45
2.6.2.1. Solución patrón y de trabajo	45

2.6.2.2. Curva estándar trolox.....	45
2.6.2.3. Lectura de muestras	46
2.6.3. Método de DPPH.....	47
2.6.3.1. Solución patrón y de trabajo	47
2.6.3.2. Curva estándar trolox.....	47
2.6.3.3. Lectura de muestras	48
2.6.4. Análisis de los datos obtenidos de mediante ABTS+ y DPPH.....	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
3.1. Humedad.....	51
3.2. Rendimiento.....	51
3.3. Propiedades físicas del aceite esencial de <i>H. racemosum</i>	52
3.3.1. Densidad del aceite esencial.....	53
3.3.2. Índice de refracción del aceite esencial.....	53
3.4. Composición química del aceite esencial de <i>H. racemosum</i>	54
3.4.1. Análisis cualitativo y cuantitativo	54
3.5. Actividad biológica del aceite esencial	63
3.5.1. Concentración mínima inhibitoria bacteriana.....	63
3.5.2. Concentración mínima inhibitoria fúngica.....	65
3.6. Actividad antioxidante del aceite esencial	67
3.6.1. Método ABTS	67
3.6.1.1. Lectura de las muestras.....	67
3.6.1.2. Lectura del estándar de trolox.....	69
3.6.1.3. Determinación del TEAC de ABTS.....	70
3.6.2. Método DPPH.....	71
3.6.2.1. Lectura de las muestras.....	71
3.6.2.2. Lectura del estándar de trolox.....	73
3.6.2.3. Determinación del TEAC de DPPH.....	75
CONCLUSIONES	76
RECOMENDACIONES	78
BIBLIOGRAFÍA.....	79
ANEXOS	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Usos etnobotánicos de la especie <i>Hedyosmum racemosum</i>	8
Tabla 2. Microorganismo de prueba.....	37
Tabla 3. Medios de cultivo y condiciones de incubación necesarias para las bacterias	39
Tabla 4. Medio de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada hongo .	43
Tabla 5. Volumen necesario para cada dilución.....	44
Tabla 6. Porcentaje de Humedad de la materia vegetal	51
Tabla 7. Rendimiento en %(p/v) del aceite esencial de <i>Hedyosmum racemosum</i>	52
Tabla 8. Densidad media del aceite esencial de <i>Hedyosmum racemosum</i>	53
Tabla 9. Índice de refracción del aceite esencial de <i>Hedyosmum racemosum</i>	54
Tabla 10. Composición química de <i>Hedyosmum racemosum</i>	57
Tabla 11. Comparación de la cantidad relativa (%) de los compuestos químicos del aceite esencial por CG-EM y CG-FID	60
Tabla 12. Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de <i>H. racemosum</i> frente a siete cepas bacterianas	64
Tabla 13. . Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de <i>H. racemosum</i> frente a dos cepas fúngicas	66
Tabla 14. Datos de las muestras de <i>Hedyosmum racemosum</i> con el método de ABTS+	67
Tabla 15. Ecuación necesaria para determinar el CI ₅₀ en ABTS+	68
Tabla 16 Datos para el estándar de trolox	69
Tabla 17. Valores de los CI ₅₀ de la muestra y el trolox para determinar el TEAC para ABTS+	70
Tabla 18. Datos de las muestras de <i>Hedyosmum racemosum</i> con el método de DPPH	72
Tabla 19. Ecuación necesaria para determinar el CI ₅₀ en DPPH.....	73
Tabla 20. Datos para el estándar de trolox	74
Tabla 21. Valores de los CI ₅₀ de la muestra y el trolox para determinar el TEAC para DPPH+	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Hedyosmum racemosum</i> con flores femeninas	9
Figura 2. <i>Trichophyton rubrum</i>	14
Figura 3. <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	15
Figura 4. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
Figura 5. <i>Enterococcus faecalis</i>	16
Figura 6. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
Figura 7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
Figura 8. Esquema de los análisis realizados	20
Figura 9. Área de recolección	21
Figura 10. <i>Hedyosmum racemosum</i> con flores femeninas	21
Figura 11. Proceso para determinar la humedad	22
Figura 12 . Proceso para extraer el aceite esencial de la materia vegetal	23
Figura 13 . a) Recolección del aceite esencial. b) frascos ámbar con aceite esencial previos a ser almacenados en refrigeración	24
Figura 14. Determinación de la densidad: a) Picnómetro vacío b) Picnómetro con agua c) Picnómetro con aceite	25
Figura 15. Lectura del índice de refracción	25
Figura 16. Esquema de las corridas cromatográficas para la obtención del aceite esencial	26
Figura 17. Diagrama de las partes básicas de un cromatógrafo de gases	28
Figura 18. Cromatógrafo de gases	28
Figura 19. a) Extracción de agua existente en el aceite b) mezcla del aceite con el Diclorometano	29
Figura 20. Parámetros operacionales del CG-EM en la columna DB-5ms	30
Figura 21. Parámetros operacionales del CG-EM en la columna HP-INNOWAX	31
Figura 22. Esquema de las partes básicas de un detector de ionización en llama	33
Figura 23. Parámetros operacionales del CG-FID en la columna DB-5ms	34
Figura 24. Parámetros operacionales del CG-FID en la columna HP-INNOWAX	35
Figura 25. Caldos de cultivos para las diferentes cepas bacterianas	38
Figura 26. Limpieza y desinfección de la cámara de trabajo	40
Figura 27. Modelo de Microplaca TC96 para bacterias con las concentraciones del aceite ($\mu\text{g/mL}$)	41
Figura 28. Placas de microdilución selladas con parafilm previas a la incubación	41
Figura 29. Muestras de aceite diluido con DMSO	42
Figura 30. Muestras del aceite <i>Hedyosmum racemosum</i> , analizadas mediante	

método ABTS+.....	46
Figura 31. Muestras del aceite <i>Hedyosmum racemosum</i> , analizadas mediante método DPPH.....	48
Figura 32. Fórmula utilizada para calcular porcentaje de inhibición.....	48
Figura 33. Fórmula para calcular TEAC	49
Figura 34. Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de especímenes hembra de <i>H. racemosum</i> obtenido en la columna DB-5ms (A) y HP-INNOWAX (B).....	55
Figura 35. Compuestos mayoritarios identificados en las tres recolecciones del aceite esencial de <i>H. racemosum</i> en la columna DB-5ms.....	59
Figura 36. Compuestos mayoritarios del aceite esencial de <i>H. racemosum</i>	62
Figura 37. Gráfica de CI_{50} de la muestra de <i>Hedyosmum racemosum</i>	68
Figura 38. Gráfica del estándar de Trolox	70
Figura 39. Gráfica de CI_{50} de la muestra de <i>Hedyosmum racemosum</i>	72
Figura 40. Curva de estándar de Trolox.....	74

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo I. Determinación de humedad	84
Anexo II. Calculo de rendimiento	85
Anexo III. Determinación de la densidad relativa a 20°C	86
Anexo IV. Determinación del índice de refracción	88
Anexo V. Referencias bibliográficas (Índices de Kóvats).....	90

RESUMEN

Hedyosmum racemosum es una planta dioica que crece en las elevaciones medias-altas. El aceite esencial fue extraído de las partes aéreas de especímenes hembras por hidrodestilación. La composición química del aceite se determinó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG/EM) y detector de ionización de llama (CG/FID). La actividad biológica fue evaluada por el método de microdilución en caldo expresada como la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la actividad antioxidante por el método del radical libre DPPH y ABTS+. También se determinó las propiedades físicas del aceite. Se identificaron 47 compuestos que representan el 99,67% del aceite. Los componentes mayoritarios fueron α -Pinene (5,43%), α -Phellandrene (26,47%), Limonene (3,36%), (Z)- β -Ocimene (4,25%), Linalool (3,51%), Estragole (16,97%), Methyl Eugenol (5,99%), y D-Germacrene (10,34%). La densidad fue de 0,9038 g/cm³ y el índice de refracción de 1,4883. El aceite mostró actividad frente a *Klebsiella pneumoniae* (CMI 250 μ g/mL), mientras que las restantes 6 bacterias y los hongos *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* no fueron inhibidos a la dosis más alta probada. El aceite presentó buena actividad antioxidante para ambos métodos con un valor de TEAC (capacidad antioxidante equivalente a Trolox) de 47,66. μ mol/gr.

Palabras claves: *Hedyosmum racemosum*, Aceite esencial, α -Phellandrene, Estragole, D-Germacrene, CMI, DPPH, ABTS.

ABSTRACT

Hedyosmum racemosum is a dioecious plant growing on medium-high elevations, the essential oil was extracted from the aerial parts of specimens from females by hydrodistillation. The chemical composition of the essential oil was determined by gas chromatography-mass spectrometry GC/EM and the flame ionization detector GC/FID. The biological activity was evaluated by the broth microdilution method and was expressed as minimum inhibitory concentrations (MICs). The antioxidant activity was investigated by free radical scavenging assay using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) and ABTS+. Oil physical properties were also determined.

Forty-seven compounds were identified, representing 99.67% of the oil. Major constituents were α -Pinene (5.43%), α -Phellandrene (26.47%), Limonene (3.36%), (Z)- β -Ocimene (4.25%), Linalool (3, 51%), Estragole (16.97%), Methyl eugenol (5.99%), and D-Germacrene (10.34%). The density of the essential oil was 0.9038 g/cm³ and the refractive index was 1.4883. The oil showed activity against *Klebsiella pneumoniae* (MIC 250 ug/mL), 6 while the remaining bacteria and *T. rubrum* *T. mentagrophytes* and fungi were not inhibited at the highest dose tested. The essential oil of this species shows good antioxidant activity by both methods with TEAC values of 47, 66 μ mol/gr.

Key words: *Hedyosmum racemosum*, Essential Oil, α -Phellandrene, Estragole, D-Germacrene, CMI, DPPH, ABTS.

INTRODUCCIÓN

El presente estudio consiste en la determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *H. racemosum* de la provincia de Loja. Se desarrolla en 3 capítulos, de los cuales el primer capítulo hace referencia al Marco teórico, que trata sobre el estado del arte de este tema, en el segundo capítulo se da a conocer las técnicas y los materiales utilizados para llevar a cabo la investigación y en el capítulo 3 se expone y analiza los resultados. Esta investigación contribuye al estudio de la flora aromática de la Región Sur del Ecuador y específicamente al proyecto “Evaluación de la flora aromática de la Provincia de Loja” que se desarrolla en la Sección de Ingeniería de Procesos de la Universidad Técnica Particular de Loja. Con este estudio se aumenta el conocimiento sobre la existencia de los aceites esenciales sus propiedades y usos para aplicaciones en las diferentes industrias tales como: Farmacéutica, Cosmética y Alimenticia; proporcionando información que será de utilidad en el Catálogo de Plantas Aromáticas. Una vez conocida la composición química, propiedades físicas, actividad biológica y antioxidante de los aceites esenciales de la región del sur del Ecuador, los mismos pueden ser usados como materia prima para las diferentes industrias o para la formulación de subproductos.

El objetivo general de desarrollar el estudio de aceites esenciales provenientes de especies vegetales, con la determinación de los componentes químicos, propiedades físicas, actividad biológica y antioxidante presentes en la planta en estudio conjuntamente con los objetivos específicos, considerados como componentes del proyecto: Extracción del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* y cálculo del rendimiento real; determinación de las propiedades físicas y composición química las mismas que nos permitirán establecer condiciones de uso, así como también la determinación de los compuestos mayoritarios y su importancia a nivel industrial; la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) con la finalidad de dar a conocer la actividad biológica y el análisis de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*, fueron desarrollados en su totalidad para contribuir al desarrollo de nuevos estudios sobre esta especie. Para lo cual se inició con la recolección del material vegetal, a la cual luego de un tratamiento post cosecha se le extrajo el aceite esencial mediante arrastre con vapor, al aceite obtenido se le determinó la densidad relativa según la norma AFNOR NF T75-111 (ISO 279:1998), el índice de refracción mediante la norma AFNOR NF 75-112 (ISO 280:1998), la composición

química utilizando cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas CG/EM y acoplada un detector de Ionización de llama CG/FID. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada por el método de microdilución en caldo usando una concentración de 5×10^5 ufc/mL para bacterias Gram-negativas [*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC9997), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2)] y bacterias Gram-positivas [*Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)], y una concentración de 5×10^4 esporas/mL para los hongos dermatofitos [*Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185)] y la actividad antioxidante mediante los métodos espectrofotométricos DPPH y ABTS determinando el CI_{50} para expresar la

MARCO TEÓRICO

1.1. Plantas medicinales

Las plantas han cumplido un papel importante en el área terapéutica gracias a las múltiples propiedades que ellas poseen por esta razón en las últimas décadas se ha dado prioridad a su estudio junto con el desarrollo de técnicas analíticas que permitan la determinación e identificación de las sustancias o principios activos contenidos en especies vegetales (Lizcano & Vergara, 2008).

Se define a las plantas medicinales como aquellos vegetales capaces de producir metabolitos secundarios, los cuales pueden ejercer alguna acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre un organismo vivo. Su utilidad primordial, es servir como droga o medicamento que alivie las enfermedades o restablezca la salud (Palacio, 2000).

En el Ecuador el uso de plantas medicinales está inmerso en la cotidianidad de sus habitantes. La medicina popular se practica principalmente por habitantes de zonas rurales pero también por ciudadanos de toda clase social. Se pueden encontrar gran variedad de plantas con usos medicinales que se expenden en mercados de la Sierra, Costa y Amazonía (De la Torre et al., 2008).

El interés por las plantas medicinales utilizadas por los pueblos aborígenes del sur de Ecuador es cada día mayor, sabiendo que un alto porcentaje de las medicinas obtenidas en las farmacias provienen de las plantas, por tal razón son numerosas las investigaciones realizadas con la finalidad de descubrir y aislar nuevas sustancias para tratar las enfermedades que afectan a la humanidad (Espinosa, 1997).

1.2. Flora Ecuatoriana

Ecuador ha ganado fama a nivel mundial en las últimas décadas por su alta diversidad biológica, y está incluida en la lista de los 17 países “megadiversos” los cuales están parcialmente o totalmente dentro de las zonas tropicales del planeta. Aparte del Ecuador, los países megadiversos incluyen, en las Américas a México, Brasil, Colombia, Perú, Venezuela y los Estados Unidos, en África a Madagascar, Sudáfrica, etc. Estos países abarcan alrededor del 70% de la biodiversidad del planeta en apenas 10% de la superficie terrestre del mundo. En superficie, Ecuador es el más pequeño de los 17 países megadiversos, con alrededor de 258.000 km², o apenas 0,02% de la superficie terrestre del planeta, excluyendo la superficie marina (Neil, 2010).

El Ecuador ha sido considerado como uno de los “lugares de mayor diversidad” del mundo, puesto que presenta la mayor cantidad de especies de animales y plantas por km². Esto se explica por el clima que le confiere su ubicación territorial y la gran cantidad de hábitats diferentes existentes dentro de sus fronteras. Evidentemente, en los fríos y altos Andes viven especies muy distintas a las de las bajas selvas tropicales. Si se incluyen todas las zonas intermedias y se añade la región costera, el resultado es una abundancia de ecosistemas, fauna y flora (Vázquez & Saltos, 2009).

1.3. La familia Chloranthaceae

La familia Chloranthaceae es una familia pequeña y consta de 4 géneros *Sarcandra*, *Chloranthus*, *Hedyosmum* y *Ascarina* distribuidos en 70 especies. Las especies de esta familia son ampliamente utilizadas en medicina popular como antiespasmódica, antiséptica, medicamentos contra el cáncer, alivio del dolor y para el tratamiento de infecciones de la piel (Caoa et al., 2008). El género *Hedyosmum* se presenta como árboles o arbustos, monoicas o más frecuentemente dioicas, a menudo fuertemente aromáticas (Zamora, 2006).

1.3.1. Género *Hedyosmum*

El género *Hedyosmum* se presenta como árboles o arbustos, monoicas o más frecuentemente dioicas, a menudo fuertemente aromáticas, con las ramas quebradizas, articuladas en los nudos, hojas opuestas; Las inflorescencias masculinas dispuestas en forma de una, varias o de conjuntos ramificados de espigas terminales o axilares, las inflorescencias femeninas están dispuestas en forma de racimos o panículas (Rzedowski, 2006). Este género es el de mayor abundancia en la región andina de Sur América, donde se encuentran más de dos tercios de sus especies. Su hábitat es en las montañas encontrándose en regiones que estén bajo la influencia de las nieblas o, en zonas más secas (Bercion, Baltaze, & Bourgeois, 2005). Existen 16 especies de *Hedyosmum* que se reportan en el Ecuador (Gulavisí, 2008).

El género *Hedyosmum* presentan un agradable aroma acre que emanan las zonas expuestas de la planta. El nombre *Hedyosmum* deriva del griego *hedy* (placentero) y *osmum* (olor), refiriéndose a este olor el cual es asociado con la pimienta, el limón y el anís (Kubitzki, Rohwer, & Bittrich, 1993).

1.3.2. *Hedyosmum racemosum*

La infusión de las hojas de *H. racemosum* se usan como agua aromática. El tallo se usa en construcción por ser fuerte y resistente al agua. Se usa junto con *Bixa orellana*, para reducir hinchazones, junto con *Cordia nodosa* para tratar mordeduras de serpientes (De la Torre et al., 2008).

En la tabla 1 se exponen los usos etnobotánicos atribuidos comúnmente a la especie *Hedyosmum racemosum* en el Ecuador.

Tabla 1. Usos etnobotánicos de la especie *Hedyosmum racemosum*

<i>Hedyosmum racemosum</i>			
Nombre común	Ubicación	Uso popular	Referencia
Alcopa, Asarcito,	Cañar,	Reumatismo	(Castañeda, Muñoz,
Masamoche, Asarcito,	Carchi, Loja,		Martínez, &
Asarquiro, Choleta, Asancito	Morona-Santiago,	Antibacteriano	Stashenko, 2007)
Acha Guayusa, Úntuntup	Napo,		(R Bussmann et al.,
(shuar chicham), Guayusa	Pastaza,		2010)
de monte, Jicamilla grande	Pichincha,	Bronquitis, resfriado, tos,	(Rainer. Bussmann et
(Castellano).	Sucumbíos,	asma, dolor óseo, y sistema	al., 2008)
	Zamora.	nervioso,	(Ginatta, 2012)
		Estomacal digestivo	

Fuente: (Sutherland, 2014)

Debido a los usos que se le atribuyen a esta planta es necesario aportar diversificando y ampliando el espectro de estudios de este género, con el fin de obtener aceites esenciales, teniendo en cuenta que estas plantas hacen parte de nuestro entorno, pero que de un modo u otro no han sido estudiadas como la especie *Hedyosmum racemosum* con flores femeninas, cuyos aceites no han sido identificados químicamente, y probablemente no se han reportado estudios sobre la actividad biológica y antioxidante a pesar de que la especie pertenece a la familia Chloranthaceae que se caracteriza por poseer plantas bastante aromáticas siendo empleada por las comunidades indígenas en su medicina tradicional, como anteriormente se mencionó.

1.3.3 Taxonomía de *Hedyosmum racemosum*.

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Chloranthales
Familia: Chloranthaceae
Género: *Hedyosmum*
Especie: *racemosum*

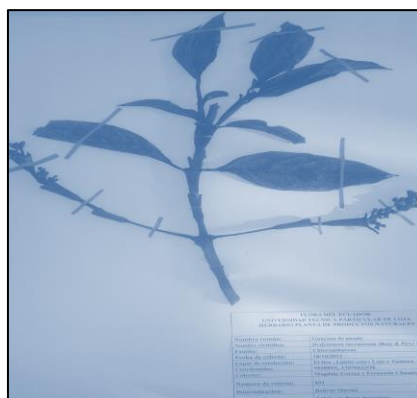


Figura 1: *Hedyosmum racemosum* con flores

Fuente: Herbario PPN-UTPL

1.4. Aceites esenciales

1.4.1. Generalidades

Los principios activos de las plantas pueden ser sustancias simples (como alcaloides) o bien mezclas complejas (resinas, aceites esenciales, etc.). Los compuestos más comunes son los azúcares y heterósidos (azúcar más un compuesto sin azúcar) que pueden ser glúcidos, galactósidos, etc. Otros componentes activos de las plantas son alcaloides, lípidos, gomas, mucilagos, taninos, aceites esenciales, camarinas, flavonoides, terpenos resinas, etc. (I. Pérez, 2008).

Se estima que más de 100.000 metabolitos secundarios son producidos por las plantas, y cada año se describe aproximadamente 1600 estructuras químicas nuevas obtenidas a partir de plantas, de las cuales un gran número tiene actividad biológica (Pérez & Jiménez, 2011).

Los aceites esenciales son producto del metabolismo secundario de las plantas; la mayoría de ellos son volátiles y son responsables del olor del vegetal. Es característica de las esencias la presencia de terpenos, fundamentalmente mono y sesquiterpenos, que pueden estar asociados o no a otros componentes (Moreno, Crescente, Ortiz, & Quintero, 2009).

Los aceites esenciales extraídos de las plantas aromáticas son una fuente de ingresos importantes para el desarrollo de los pueblos alejados de las grandes ciudades (Meza & Usubillaga, 2007).

Sin embargo, la composición química de cada planta puede diferir considerablemente así sean de la misma familia, por esto es conveniente saber la composición exclusiva de cada especie, ya que pueden estar diferentes compuestos, pudiendo ser derivados bencénicos, fenoles, ésteres e hidrocarburos lineales o hasta por componentes difícilmente relacionables con las esencias, como alcaloides y una gran variedad de compuestos heterocíclicos como derivados piridínicos, sulfuros, aminas, etc. Es por eso que de cada especie es aconsejable hacer un estudio de los diferentes compuestos presentes en la esencia, determinando cual está en mayor o menor cantidad (Bandoni, 2002).

La mayor parte de los aceites esenciales son de olor agradable. El olor dependerá de los componentes que contengan el aceite, o la planta de la que se lo extrae. No todas las plantas poseen aceites esenciales, y muchas tienen una cantidad muy pequeña que hace imposible la extracción del mismo. De los millones de plantas existentes en el mundo se conocen aproximadamente 4000 distintos aceites esenciales (Pozo & Naranjo, 2006).

Los aceites esenciales se forman en las partes verdes de las plantas donde hay clorofila y de ahí son transportados a tejidos, principalmente a los brotes de la flor, estos son producidos por la planta para combatir gérmenes o infecciones, además los usan como mecanismo de defensa y para atraer animales para la polinización (Olaya & Méndez, 2003).

A nivel mundial existen diversos estudios que se han realizado con los aceites esenciales obtenidos de diferentes plantas clasificadas como medicinales o como especias; la intención de estos estudios ha sido diferente en el sentido de buscar compuestos que inhiban el crecimiento ya sea de bacterias, hongos, virus o parásitos, en alimentos, en aguas residuales, o también para ser utilizados como medicamentos (Benkeblia, 2004; Delaquis, Stanich, Girard, & Mazza, 2002).

1.4.2. Clasificación

Existen tres diferentes tipos de clasificación de los aceites esenciales. La primera clasificación se la hace de acuerdo a su consistencia o características físicas. Para este criterio hay tres grupos: esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las esencias fluidas son

aquellas que presentan volatilidad a temperatura ambiente. Los bálsamos son líquidos más espesos, poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización. Ejemplos: bálsamos de copaiba, benjuí, bálsamo de tolú, estoraque, etc. Las oleorresinas son líquidos viscosos o sustancias semisólidas que tienen el aroma de la planta muy concentrado. Ejemplo: trementina, colofonia, etc. (Martínez, 2003).

Otra clasificación de los aceites esenciales es de acuerdo a su origen. Estos pueden ser naturales, artificiales o sintéticos. Los naturales son aquellos que son obtenidos directamente de la planta sin haber sufrido ninguna alteración tanto física como química. La actividad terapéutica que presentan los aceites esenciales naturales se debe a la interacción de muchos de sus componentes en diversos sistemas del organismo (Martínez, 2003).

Los aceites de fuentes artificiales son aquellos obtenidos de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes. La producción artificial de los aceites esenciales es sumamente complicada debido a la compleja composición de los mismos. Ejemplo: mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín, enriquecida con linalol, esencia de anís enriquecida con anetol (Martínez, 2003).

Los sintéticos son aquellos producidos por la combinación de sus componentes los cuales han sido producidos por síntesis química. Los aceites producidos sintéticamente tienen la gran ventaja de ser de menor costo económico, esto se debe a que sólo posee varios componentes del aceite esencial natural y por lo tanto no posee todas sus características benéficas. Ejemplo: esencias de vainilla, fresa, limón, almendra, etc. Por último, también se clasifica a los aceites esenciales de acuerdo a su composición química, esto es de acuerdo a la composición mayoritaria de las sustancias que los componen. Por ejemplo los aceites que contienen en su estructura mayor cantidad de monoterpenos se los conoce como monoterpenoides, por ejemplo: aceites de hierbabuena, albahaca, salvia. Así mismo hay los aceites sesquiterpenoides compuesto por sesquiterpenos. Por ejemplo: aceite de copaiba, pino, junípero, etc. o los fenilpropanoides compuestos principalmente por fenilpropanos como el aceite de clavo, canela, anís, etc. (Martínez, 2003).

1.4.3. Extracción

La destilación por arrastre con vapor que se emplea para extraer la mayoría de los aceites esenciales es una destilación de la mezcla de dos líquidos inmiscibles y consiste, en resumen, en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de

los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua, el cual ejerce la doble función de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición y disminuir la temperatura de ebullición por adicionar la tensión del vapor que se inyecta, a la de los componentes volátiles de los aceites esenciales. Los vapores que salen del cuello de cisne se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, los dos productos inmiscibles, agua y aceite esencial y finalmente se separan en un decantador o vaso florentino (Bandoni, 2002).

1.4.4. Caracterización química de los aceites esenciales

La técnica cromatográfica más importante para el análisis de los aceites esenciales es, sin duda la cromatografía de gases (CG). En el control de calidad, la CG se utiliza para obtener el perfil cromatográfico y cuantificar los principales componentes del aceite esencial, es decir los mayoritarios o aquéllos que, sin ser mayoritarios, tengan una especial trascendencia para la calidad (Bandoni, 2002).

En la cromatografía de gases los componentes de una muestra vaporizada se separan como consecuencia del reparto entre una fase gaseosa y una fase estacionaria contenida en una columna. Al efectuar una separación cromatográfica de gases, la muestra se vaporiza y se inyecta en la cabeza de la columna. La elución se lleva a cabo mediante el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de la mayoría de las otras técnicas cromatográficas la fase móvil no interactúa con las moléculas de los compuestos a separar, su única función es transportar los compuestos a través de la columna (Montoya & Páez, 2012).

En la actualidad la cromatografía de gases es una técnica analítica usada en muchos laboratorios universitarios, de investigación e industriales, debido a su alta resolución, sensibilidad y selectividad. Además de las aplicaciones típicamente analíticas, la cromatografía de gases puede utilizarse a escala preparativa para la obtención de compuestos de elevada pureza, así como también es posible la obtención de datos físico-químicos relativos a propiedades superficiales y termodinámica de procesos de adsorción, separación, y desarrollo de catalizadores (Montoya & Páez, 2012).

1.4.5. Propiedades

Las propiedades que presentan los aceites esenciales son beneficiosas para el ser humano y por lo tanto son cotizados en el mundo cuando son de origen natural. Dependiendo de la procedencia del aceite, de la forma de extracción y de sus componentes serán las propiedades del mismo, sin embargo todos los aceites esenciales presentan ciertas propiedades a diferentes niveles, los cuales darán el uso que tendrá el mismo (Berger, 2007).

Una gran cantidad de aceites esenciales presentan actividad antimicrobiana la cual se debe a constituyentes activos atribuidos a isoprenos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos, alcoholes y otros hidrocarburos. La acción antimicrobiana de estos componentes se debe a las características lipofílicas de los hidrocarburos y a las hidrofílicas de los grupos funcionales. El rango de actividad antimicrobiana ha sido definida de acuerdo a los componentes de la siguiente manera de mayor a menor: fenoles, aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres e hidrocarburos (Berger, 2007).

Generalmente el mayor componente del aceite esencial es el responsable de la actividad antimicrobiana, sin embargo estudios han demostrado que en algunos casos todos los componentes presentes en aceite esencial presentan mayor actividad antimicrobiana que el principal componente del mismo lo que da a entender que los componente minoritarios también son factores críticos en cuanto a esta actividad específica del aceite. Por otro lado se ha demostrado que la actividad de diferentes componentes combinados era menor que la actividad de uno solo de ellos. Debido a la larga lista de grupos que forman los aceites esenciales es muy común el no atribuir la actividad antimicrobiana del mismo a un solo compuesto (Berger, 2007).

1.4.6. Usos y aplicaciones

Los aceites esenciales han sido utilizados y conocidos desde la antigüedad, especialmente en el área de la medicina. Son productos con alta actividad terapéutica debido a tener procedencia natural y por lo tanto son usados en la industria farmacéutica. En cosmética se utilizan en la fabricación de perfumes corporales, ambientadores, aromas, etc. En la industria alimenticia también se usa como saborizantes para condimentos, licores, dulces, golosinas, cosméticos (Albán & Freire, 2009; Ryman, 1995).

1.5. Actividad Biológica

Actualmente la población crece aceleradamente y con ella también las enfermedades producidas por bacterias, virus, hongos, etc. A pesar que existen muchos antimicrobianos para su control o tratamiento, el uso irracional de éstos viene generando resistencia microbiana y otras secuelas. La biodiversidad vegetal ofrece alternativas antibacterianas y antifúngicas. Existen algunos estudios en especies vegetales con excelentes resultados, debido a sus constituyentes químicos (Fuertes & Munguía, 2001).

Entre los organismos patógenos causantes de múltiples enfermedades infecciosas y que se evaluarán en la presente investigación se encuentran los dermatofitos *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*, así como bacterias Gram positivas: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y bacterias Gram negativas: *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgares*, *Escherichia coli*, *Salmonella tiphymurium*,.

1.5.1. Hongos

Los estudios epidemiológicos relativos a infecciones por dermatofitos se han realizado en muchos países y las diferencias en la incidencia y los agentes etiológicos han sido reportados en diferentes lugares geográficos. En los últimos años se ha visto a nivel mundial un incremento en la frecuencia de casos de dermatofitosis conocidas como “tineas” o “tiñas”, de todas las especies de dermatofitos, las cosmopolitas *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton tonsurans* y en especial, *Trichophyton rubrum* son las responsables de la mayoría de las dermatofitosis (Angulo et al., 2008).

Trichophyton rubrum (Figura 2): Es un hongo filamentoso con micronidios piroformes, sésiles sobre las hifas formando racimos. Posee macroconidios muy escasos, con varios tabiques, de formas irregulares, de pared fina y lisa, al final de la hifa. Abundan las clamidosporas intercalares, presentan hifas en raqueta, pero no filamentos espirales. Crece bien en la mayoría de los medios de cultivo comunes. Es el agente más común de dermatofitosis (tinea pedis, tinea corporis y onicomicosis) con lesiones

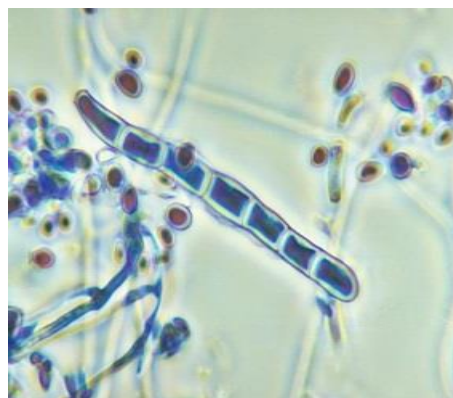


Figura 2. *Trichophyton rubrum*.
Fuente: Base de datos Wikipedia

eritematosas, poco inflamatorias, pruriginosas que pueden ser resistentes a los tratamientos convencionales (Crespo, 2008).

Trichophyton mentagrophytes (Figura 3):

Es el segundo agente causal de dermatofitosis luego de *Trichophyton rubrum*. Posee numerosos microconidios semiesféricos o piriformes, con algunas hifas en espiral y clamidoconidios esféricos. Presenta dos variedades *T. mentagrophytes* var *mentagrophytes* es un organismo zoofílico y *T. mentagrophytes* var. *Interdigitale* que es antropofílico. La variedad

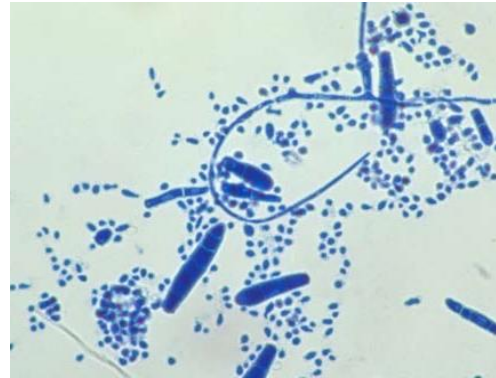


Figura 3. *Trichophyton mentagrophytes*.

Fuente: Base de datos doctor fungus.

antropofílica produce mínima reacción inflamatoria usualmente en la piel interdigital de los pies, y la variedad zoofílica produce considerable inflamación y ampollas y se asocia con dermatofitides. Puede producir tinea capitis, tinea pedis, tinea corporis, tinea barbae y tinea unguium. Un rasgo único de esta especie es su capacidad de perforar pelo in vitro que ayuda a diferenciarlo de *T. rubrum* (Rueda, 2002).

1.5.2. Bacterias

Las bacterias son microorganismos que poseen una amplia distribución en la naturaleza, según las características de su pared celular las bacterias pueden dividirse en dos grupos: Gram-positivas y Gram- negativas (Ruiz & Moreno, 2005).

1.5.2.1. Bacterias Gram positivas.

Staphylococcus aureus (Figura 4): Es una bacteria anaerobio facultativa, inmóvil, no esporulante que generalmente se dispone en racimos irregulares, forma parte de la flora microbiana normal de la piel humana llegando a producir enfermedades mediante la capacidad de proliferar y propagarse ampliamente por los tejidos y la capacidad de producir toxinas y enzimas extracelulares. Estas enfermedades pueden ser infecciones cutáneas, de las mucosas y del tracto gastrointestinal (Lowy, 1998).

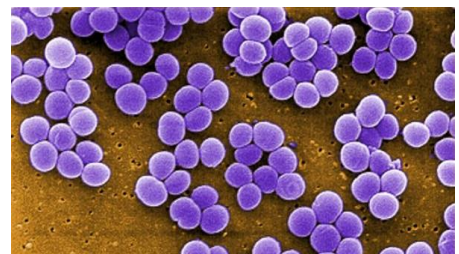


Figura 4. *Staphylococcus aureus*.

Fuente: Centers for Disease Control and Prevention.

Enterococcus faecalis (Figura 5): Existen al menos 12 especies de enterococos. El *Enterococcus faecalis* es el más común y causa 85 a 90% de infecciones enterocócicas. Los enterococos se consideran una de las causas más comunes de infecciones nosocomiales, estos se transmiten de un paciente a otro principalmente por las manos del personal del hospital (Brooks et al 2005). Los enterococos pueden producir infecciones en el tracto urinario, vejiga, próstata, epidídimo (Hancock & Perego, 2004).

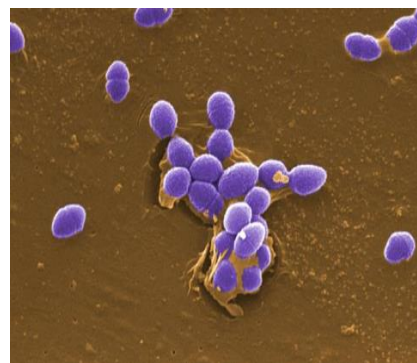


Figura 5. *Enterococcus Faecalis*

Fuente: Centers for Disease Control and Prevention.

1.5.2.2 Bacterias Gram negativas.

Klebsiella pneumoniae (Figura 6): Los factores de patogenicidad son la cápsula y la endotoxina, que es un factor antifagocitario que puede infectar diversos tejidos, especialmente del aparato respiratorio (Romero, 2007). Es de importancia en el ámbito hospitalario, frecuentemente relacionado con infecciones nosocomiales en unidades de cuidado intensivo y salas de pediatría desde donde se

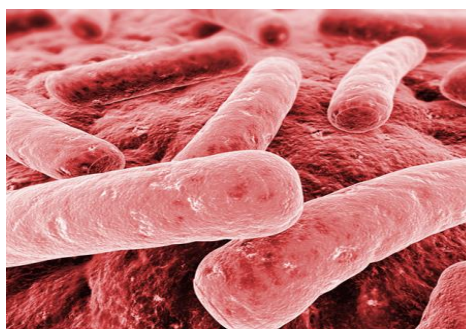


Figura 6. *Klebsiella pneumoniae*.

Fuente: Base de datos Bioquel.

aíslan cada vez con más frecuencia cepas resistentes a cefalosporinas de tercera generación con resistencia combinada (corresistencia) a múltiples antibióticos. Con la proliferación de cepas multirresistentes, el problema de las infecciones intrahospitalarias causadas por este microorganismo es aún mayor, ya que al ser más difíciles de tratar dan lugar a incrementos en las tasas de mortalidad. Actualmente con la finalidad de contribuir al conocimiento de los factores que han favorecido el desarrollo de la infección nosocomial se ha combinado procedimientos microbiológicos, bioquímicos y de biología molecular (Espinal et al., 2004).

Salmonella typhimurium: Las salmonellas son bacilos dotados de motilidad mediante flagelos peritricos, con frecuencia son patógenos para humanos y animales cuando se adquieren por vía oral. Puede causar enteritis, infección sistémica y fiebre entérica (Brooks et al 2005).

Pseudomonas aeruginosa (Figura 7): Es considerado el más resistente a los antibióticos y es uno de los microorganismos responsables de bacteriemias frecuentes, tiene una mayor mortalidad que las otras especies de *Pseudomonas* (Bodi & Garmacho, 2007). Forma parte del grupo de bacilos Gram-negativos no fermentadores, móviles y aerobios que puede desarrollarse en forma anaerobia utilizando nitrato o arginina. Es un microorganismo oportunista de amplia distribución ambiental, presente en la tierra, materia orgánica en descomposición, vegetales y agua (Sandoval, Moreno, & Abarca, 2011).

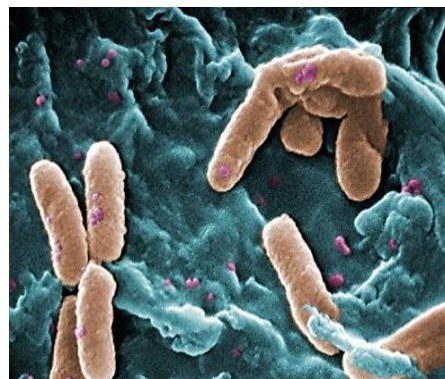


Figura 7. *Pseudomonas aeruginosa*.

Fuente: Centers for Disease Control and Prevention.

***Proteus vulgaris*:** Su hábitat natural es el intestino del hombre y producen infecciones sólo cuando este abandona el mismo. Se les encuentra en infecciones del aparato urinario y producen bacteremia, neumonía e infecciones focales en pacientes debilitados o también aquellos que son tratados con infusiones intravenosas (Brooks, Butel, & Morse, 2005).

***Escherichia coli*:** Son comensales normales que se encuentran en el tracto digestivo, las cepas patógenas de este organismo se distinguen de la flora normal por poseer factores de virulencia, como exotoxinas, que puede causar diarrea o colitis hemorrágica en los humanos (Faleiro, 2009). Esta bacteria se transmite por consumo de alimentos mal cocidos o crudos, ingestión de agua contaminada, contacto persona a persona, contacto materia fecal de animales (Michanics, 2003).

1.5.3. Enfermedades microbianas

Las enfermedades microbianas, constituyen uno de los problemas terapéuticos más importantes de la medicina moderna. La utilización de plantas medicinales para el tratamiento de diferentes enfermedades, incluidas la de etiología microbiana, constituye en la actualidad un desafío en la medicina y se ofrece como una alternativa, especialmente en aquellas patologías que son provocadas por agentes resistentes. Sin duda el reino vegetal ofrece una gran gama de especies de plantas que son potencialmente útiles para ser aplicadas a las enfermedades humanas, en concreto a aquellas producidas por microorganismos.

1.6 Actividad antioxidante

Los antioxidantes son compuestos que inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas, inhibiendo la iniciación o propagación de las reacciones oxidativas en cadena. Los antioxidantes naturales constituyen un amplio grupo de compuestos que incluye principalmente compuestos polifenólicos y vitaminas (Barrero., Pino., Burón., Moral, & Arteaga., 2004).

El butilhidroxianisol (BHA), y el butilhidroxitolueno (BHT) son los antioxidantes sintéticos de mayor uso industrial, sin embargo, se han encontrado efectos secundarios en humanos, como el aumento del colesterol, hepatomegalia e inducción de cáncer hepático, entre otras, por lo cual algunos países están aplicando fuertes restricciones a su uso y existe una tendencia a sustituirlos por antioxidantes naturales, ocasionado así una creciente demanda por encontrar más información concerniente al potencial antioxidante de nuevas especies de plantas para su utilización en las industrias alimentarias, cosméticas y farmacéuticas (Arango, Pantoja, & Santacruz, 2012).

Adicionalmente, muchos desordenes de la salud como cáncer, enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, gastritis, daños en el sistema nervioso central y aceleración del envejecimiento, entre otros, son atribuidos a la acción de los radicales libres (Arango et al., 2012).

MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología utilizada en la presente investigación se llevó a cabo en el Departamento de Química de la UTPL y se detalla a continuación:

- Recolección y selección del material vegetal
- Extracción del aceite esencial.
- Determinación de las propiedades físicas del aceite esencial
- Identificación de las composición química del aceite esencial
- Evaluación de la actividad biológica del aceite esencial
- Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial.

En el siguiente esquema se puntualiza la metodología utilizada en esta investigación:



Figura 8. Esquema de los análisis realizados

Fuente: La autora

2.1. Recolección del material vegetal

Se recolectó la material vegetal en el sector “EL Tiro” entre el límite de la provincia de Loja y Zamora a 2762 m s.n.m con coordenadas 955889N, 17070622OE (Figura 9).

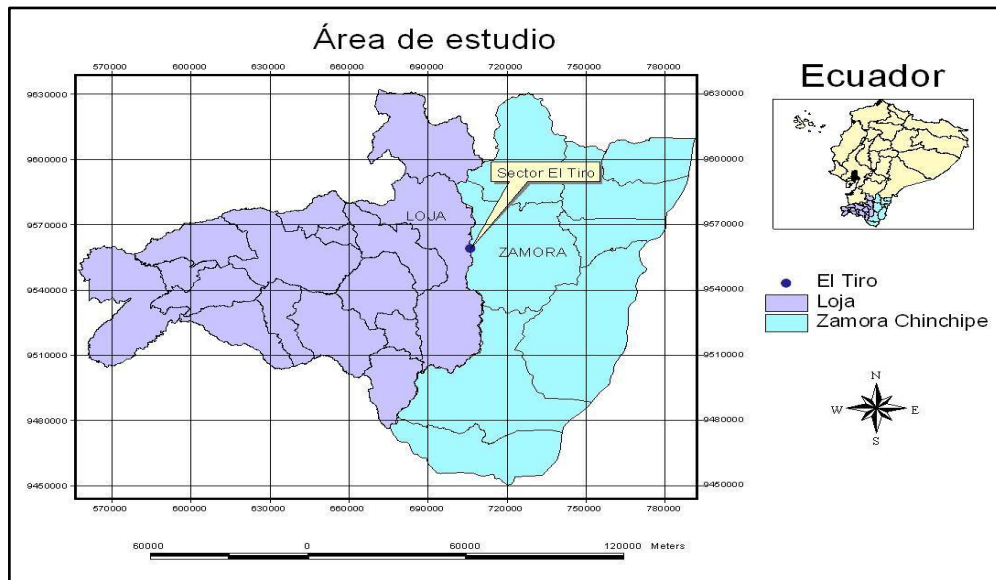


Figura 9. Área de recolección de la especie *Hedyosmum racemosum* en la provincia de Loja

Fuente: La autora

Las partes aéreas de *H. racemosum* se recolectaron en estado de floración (Figura 10), la especie fue identificada por el Ing. Bolívar Merino y una muestra botánica fue depositada en el Herbario del Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja, bajo el código 803.



Figura 10. *Hedyosmum racemosum* con flores femeninas

Fuente: La autora

La recolección de la muestra vegetal se realizó en tres salidas de campo, posteriormente la muestra fue transportada a los laboratorios del Departamento de Química de la UTP para

su tratamiento post cosecha el mismo que consistió en seleccionar el material vegetal, eliminando cualquier impureza o partes deterioradas de la planta con el fin de evitar contaminaciones.

2.1.1. Determinación de la Humedad

Se partió de las hojas de *H. racemosum*, las cuales se cortaron en pequeños pedazos con el fin de obtener una muestra más compacta y homogénea; posterior a ello se colocó aproximadamente 1 g de la materia vegetal en cápsulas de porcelana. Luego las cápsulas con el material vegetal fueron colocadas en la lámpara ULTRA X por 45 minutos y posteriormente fueron colocadas en el desecador por 5 minutos, se registró el peso y se expuso nuevamente el materia vegetal a la lámpara por 15 minutos con la finalidad de eliminar el agua presente en la especie estudiada, este proceso se realizó de 3 a 4 veces hasta que el peso se mantenga estable (Figura 11).

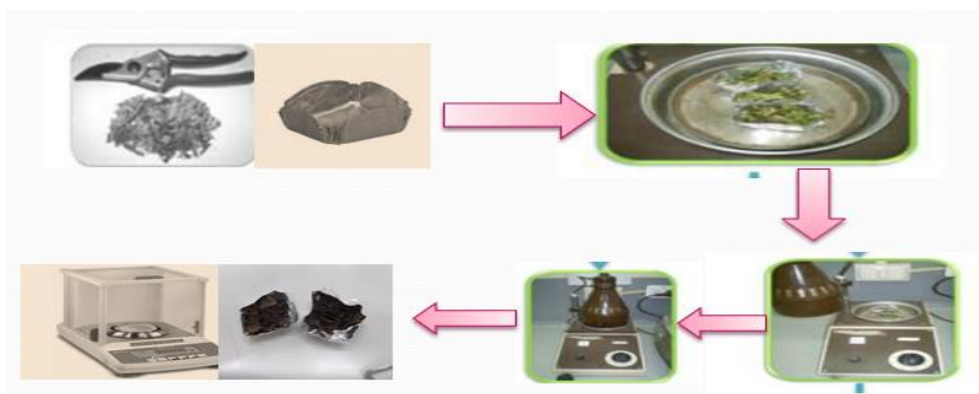


Figura 11. Proceso para determinar la humedad

Fuente: La Autora

La determinación de la humedad se realizó por triplicado en cada recolección con el objetivo de obtener resultados confiables.

Una vez finalizado todo el procedimiento se realizó los cálculos respectivos para determinar la Humedad (Anexo I).

2.2 Extracción del aceite esencial

Luego de haber realizado el tratamiento post cosecha se procedió a la obtención del aceite esencial por medio de la destilación con arrastre de vapor, dicho proceso consistió en separar los componentes insolubles en agua y ligeramente volátiles de otros no volátiles que se encuentran en la mezcla, en este caso del aceite esencial mediante vapor de agua seguida de la condensación.

La extracción del aceite se efectuó en un destilador (figura 12) que consta de un tanque de acero inoxidable en el que se colocó agua con el material vegetal troceado sobre una placa perforada. Al tapar el tanque de extracción se colocaron las mangueras de entrada y salida de agua del refrigerante así como el sello de agua en los bordes del destilador; el recipiente se expuso a una fuente de calor ubicada en la parte inferior de tal forma que el vapor de agua generado, circule a través de la material vegetal y al salir del cuello del cisne se enfríe en el condensador en donde pasa al estado líquido, este líquido es recibido en un florentino en el cual se produce la separación de agua y aceite por diferencia de densidades. Este proceso se realizó por triplicado es decir se realizaron nueve destilaciones obteniéndose tres muestras de aceite esencial por cada una de las tres recolecciones.

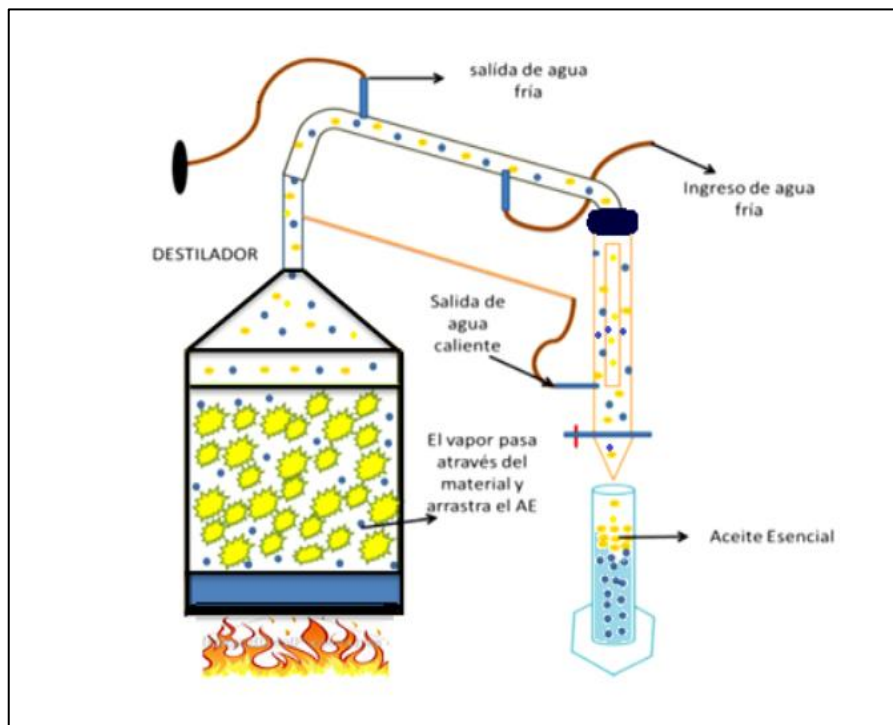


Figura 12. Proceso para extraer el aceite esencial de la materia vegetal

Fuente: La Autora

El aceite esencial fue recogido en una probeta para medir su volumen (Figura 13 a), para luego ser envasado en recipientes de color ámbar con su respectivo código asignado, para cada aceite se hizo constar las iniciales de la especie vegetal, el número de recolección, la fecha de recolección y el número de destilación (Figura 13b) Finalmente las muestras fueron almacenadas en refrigeración a -4°C , con el fin de mantener el aceite en buenas condiciones.



Figura 13. a) Recolección del aceite esencial. **b)** Frascos ámbar con aceite esencial previos a ser almacenados en refrigeración

Fuente: La Autora

2.2.1. Determinación del rendimiento

El rendimiento del aceite esencial depende mucho del estado fenológico y las condiciones en la que la materia vegetal fue sometida a destilación. Para determinar el rendimiento se relacionó el volumen de aceite esencial obtenido en cada destilación a partir de la cantidad de materia vegetal utilizada (Anexo II).

2.3 Determinación de las propiedades físicas

2.3.1. Densidad relativa

La densidad se determinó según la norma ANFOR NFT75-111 (Anexo III), para este análisis se trabajó con las muestras obtenidas de la mezcla de los tres aceites por cada recolección, para los valores obtenidos se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación.

Se utilizó un picnómetro de 2mL, una balanza y un termómetro; el primer paso a seguir es obtener el peso inicial del picnómetro vacío, seguido se registra el peso del picnómetro con agua y finalmente con el aceite esencial (Figura14; a, b y c); en el Anexo III se muestran la fórmula para determinar la densidad del aceite esencial.

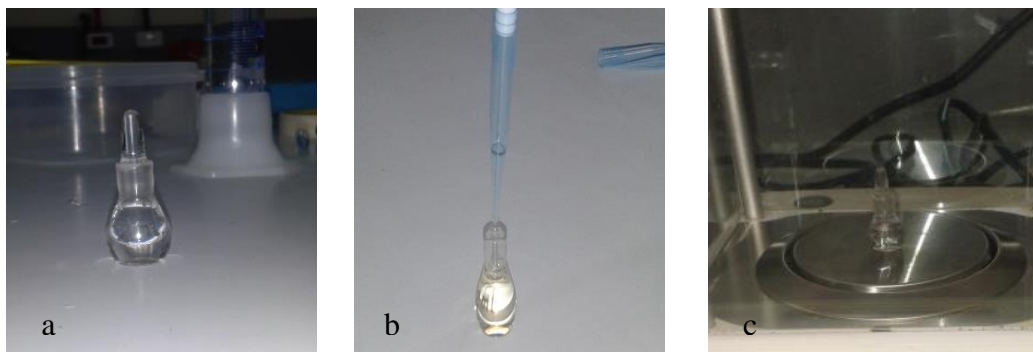


Figura 14. Determinación de la densidad: **a)** Picnómetro vacío **b)** Picnómetro con agua
c) Picnómetro con aceite

Fuente: La Autora

2.3.2. Índice de refracción

El índice de refracción se determinó según la norma ANFOR NF 75-112 25, en el cual se utilizó el refractómetro ABBE, marca BOECO GERMANY, disponible en el laboratorio de Ingeniera de Procesos.

Para ello se colocó una gota de aceite esencial y se procedió a la respectiva lectura. En el anexo IV se muestra la fórmula para determinar el índice de refracción. Se obtuvo un valor promedio a partir de las muestras obtenidas de la mezcla de los tres aceites por cada recolección (Figura 15).



Figura 15. Lectura del índice de refracción.

Fuente: La Autora

2.4 Determinación de la composición química del aceite esencial

La identificación de los componentes químicos del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa CG-EM y acoplada a un detector de ionización de llama CG-FID, dichas corridas cromatográficas se hicieron en dos columnas, una no polar DB-5ms y una polar HP-INNOWAX, con el fin de llevar a cabo el análisis cualitativo y cuantitativo respectivamente. En la figura 16, se detalla en un esquema la secuencia de las corridas cromatográficas para la obtención de los diferentes cromatogramas e identificación química del aceite esencial de la materia vegetal.

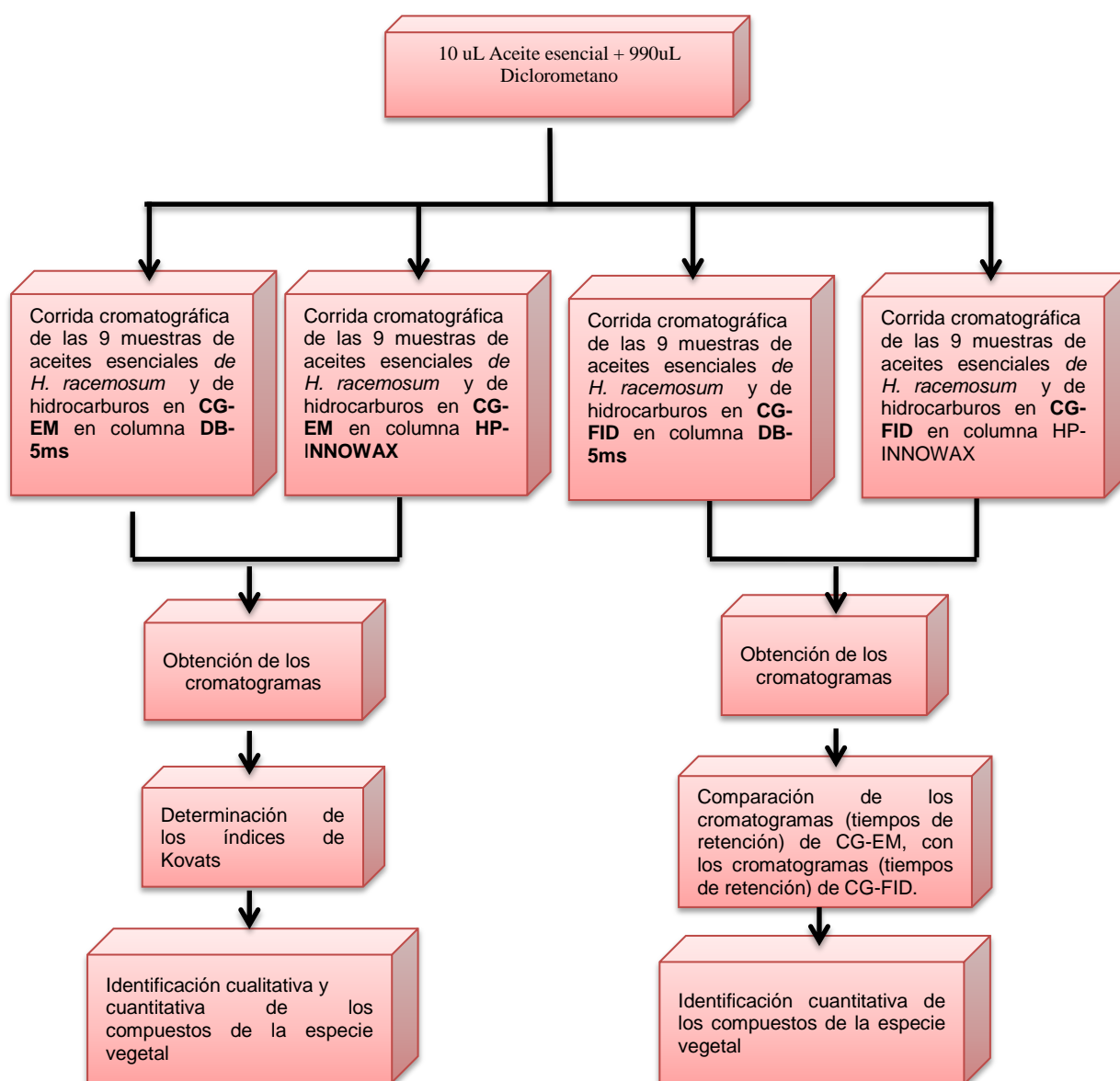


Figura 16. Esquema de las corridas cromatográficas para la obtención del aceite esencial

Fuente: La Autora

2.4.1 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es un método físico que consiste en pasar una fase móvil (una muestra constituida por una mezcla que contiene el compuesto deseado en el solvente que es generalmente un gas inerte como el helio) a través de una fase estacionaria que se encuentra fijada en una columna. La fase estacionaria retrasa el paso de los componentes de la muestra, de forma que los componentes la atraviesan a diferentes velocidades y se separan en el tiempo. Cada uno de los componentes de la mezcla presenta un tiempo característico de paso por el sistema, denominado tiempo de retención (Gutiérrez & Droguet, 2002).

Entre los detectores más utilizados caben mencionar el detector FID (ionización en llama) que por su alta versatilidad hace posible la detección de un elevado tipo de compuestos (Gutiérrez & Droguet, 2002).

El cromatógrafo de gases está constituido principalmente (Olguín & Rodríguez, 2004):

- Fase móvil (gas portador)
- Puerto de inyección
- Horno
- Columna
- Fase estacionaria
- Detector
- Sistema de registro de datos

El gas portador se almacena en un cilindro apropiado conectado al equipo mediante un regulador de presión, la muestra (aceite) se introduce en el sistema mediante jeringas, utilizando los inyectores. El inyector está a una temperatura superior a la del punto de ebullición del disolvente de la muestra y normalmente, también superior al de los analitos; y es ahí donde se produce la necesaria volatilización. La muestra se diluye en el gas portador y solo una fracción entra en la columna capilar en donde se realiza la separación; luego de pasar la columna, los analitos llegan a los detectores, donde se produce una señal eléctrica que es amplificada y enviada a un sistema de almacenamiento de datos para ser analizada (Figura 17) (Montoya & Páez, 2012).

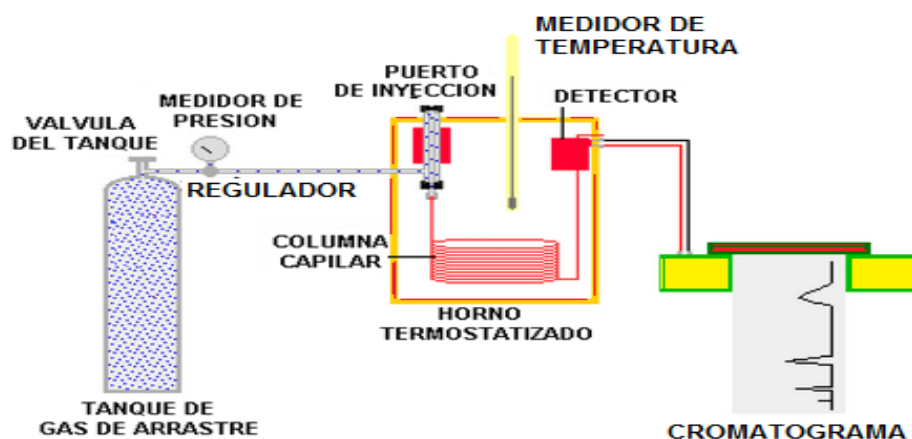


Figura 17. Diagrama de las partes básicas de un cromatógrafo de gases

Fuente: (Montoya & Páez, 2012)

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

El equipo que se utilizó en el análisis del aceite esencial de *H. racemosum* es un Cromatógrafo de Gases Agilent serie 6890N, acoplado a un Espectrómetro de Masas (EM). Agilent serie 5973 inert; el equipo dispone de un Sistema de datos “software MSD-Chemstation D.01.00 SP1, cuenta con un inyector automático split/splitless serie 7683, y un detector de ionización de llama (FID) provisto de un generador de hidrógeno “Gas Generator 9150 Packard” (Figura 18).



Figura 18. Cromatógrafo de gases

Fuente: Laboratorio del Departamento de Química.

Para los análisis cromatográficos se emplearon dos columnas capilares: una no polar DB-5ms y una polar HP-INNOWAX de 30 m*0.25 mm*0.25 µm, recubiertas internamente, la columna no polar de 5% - Fenilmetilpolisiloxano y la columna polar de Polietilenglicol.

2.4.3. Preparación de las muestras

Previo al análisis en el cromatógrafo se procedió a dar un tratamiento especial a las muestras que contienen el aceite en estudio, este se fundamenta básicamente en deshidratar las muestras que puedan contener remanentes de agua que posiblemente se quedaron al momento de recolectar los aceite en los recipientes de color ámbar, todo esto con la finalidad de evitar cualquier tipo de obstrucción en la columna. Para ello se utilizó sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) en cantidades equivalentes al agua introducida, este fue colocado en los frascos que contenían el aceite esencial, se dejó reposar por 30 minutos y se transvaso a nuevos recipientes (Figura 19a).



Figura 19: a) Extracción de agua existente en el aceite b) mezcla del aceite con el Diclorometano.

Fuente: La Autora

Luego de ser extraída el agua se colocó 10 µL del aceite esencial de *H. racemosum* y 990 µL de diclorometano grado HPLC, obteniendo 9 disoluciones a una concentración del 1%, al mismo tiempo se procedió a rotular cada uno de los viales que contenían los aceites con la finalidad de evitar errores en las corridas cromatográficas (Figura 19b). Además se realizó la

inyección de hidrocarburos (C₁₀decano a C₂₅-pentacosano) comercialmente conocidos como TPH-6RPM de CHEM SERVICE, los Hidrocarburos fueron inyectados tanto en la columna DB-5ms como en HP-INOWAX, el tiempo de retención de los hidrocarburos nos sirven como base en la determinación de los índices de Kovats los mismos que son indispensables para la identificación de los compuestos químicos, los hidrocarburos fueron inyectados bajo los mismos parámetros que los aceites.

2.4.4 Corrida cromatográfica en la columna DB-5ms acoplada a espectrometría de masas.

Los parámetros bajo los cuales fueron inyectados las muestras del aceite esencial de *H. racemosum* usando la columna no polar DB-5ms se indican en la figura 20.

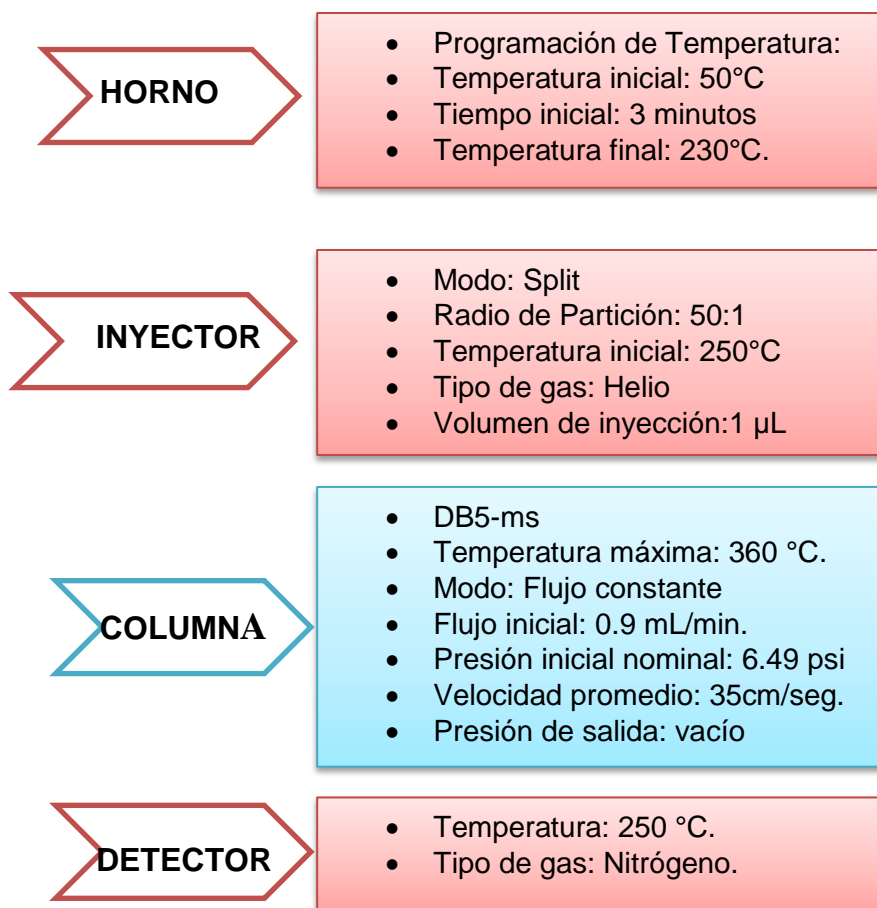


Figura 20. Parámetros operacionales del CG-EM en la columna DB-5ms

Fuente: La Autora

2.4.5. Corrida cromatográfica en la columna HP-INNOWAX acoplada espectrometría de masas

En la figura 21, se muestran los parámetros operacionales bajo los cuales se inyectaron las muestras y los hidrocarburos en la columna polar HP-INNOWAX.

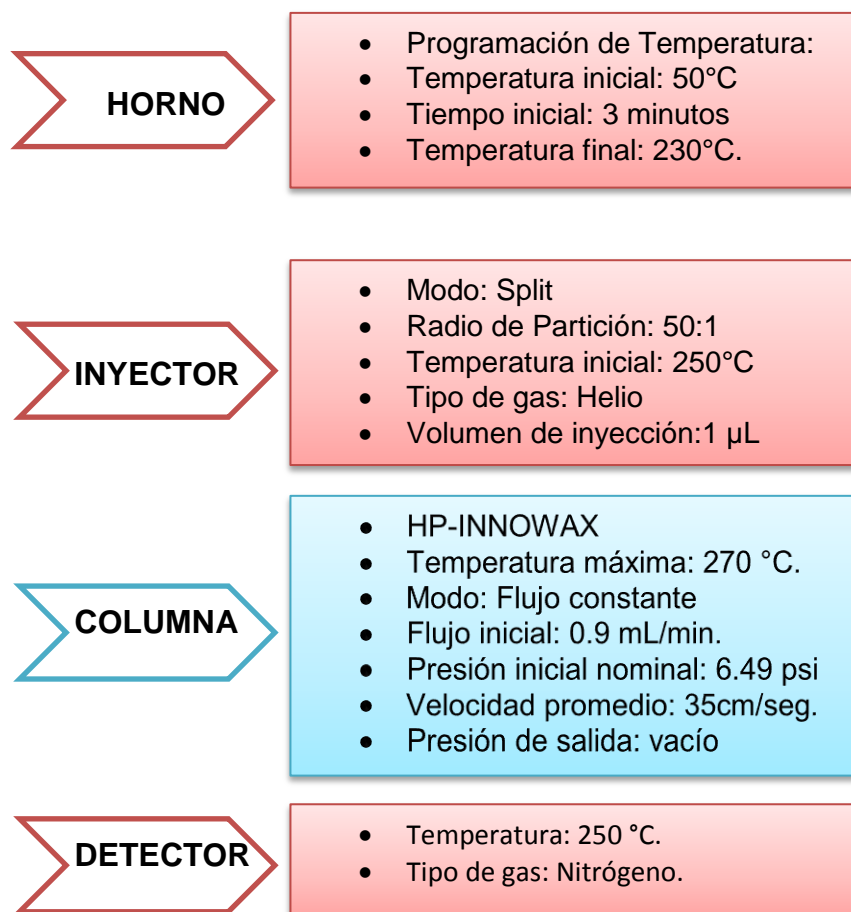


Figura 21. Parámetros operacionales del CG-EM en la columna HP-INNOWAX

Fuente: La Autora

2.4.6 Identificación cualitativa y cuantitativa de los componentes químicos del aceite esencial

Como resultado de la corrida cromatográfica, los compuestos se visualizaron en un cromatograma el cual se define como una representación gráfica de la señal producida por el detector en función del tiempo o del volumen de elución. La identificación de los componentes de la muestra se lleva a cabo a partir de la posición de los distintos picos respecto al eje del tiempo mientras que el área de cada uno, proporcional a la concentración del compuesto, permite el análisis cuantitativo.

Para que la identificación sea más precisa y confiable se procedió a integrar, lo cual nos permite tener una determinada cantidad de compuestos en cada una de las muestras a analizar, esto se realizó a través del sistema de integración propio del software del equipo para luego trabajar con los picos integrados.

Obtenido los cromatogramas se procedió a calcular 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 el n-alcano;

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

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

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

La identificación de los compuestos se llevó a cabo en base a los índices de Kovats (IK) determinados experimentalmente en las corridas cromatográficas tanto en la columna polar como en la apolar, 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. Además se tomó en cuenta parámetros como el número de CAS que presenta cada compuesto de tal modo

que facilite la búsqueda y la identificación de los IK de los constituyentes químicos del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*.

2.4.7. Corrida cromatográfica en la columna DB-5ms acoplada al detector de ionización en llama (FID)

El detector de ionización de llama es el que más se utiliza y por lo general uno de los que más se aplican en cromatografía de gases. El efluente de la columna se dirige a una pequeña llama de hidrogeno y aire. La mayoría de los compuestos orgánicos producen iones y electrones cuando se pirolizan a la temperatura de una llama de hidrógeno-aire. La detección implica controlar la corriente producida al recolectar estos portadores de carga. Cuando se aplica una diferencia de potencial de unos pocos cientos de volts entre el extremo del quemador y un electrodo colector situado por encima de la llama, los iones y los electrones se dirigen hacia el colector (Figura 22).

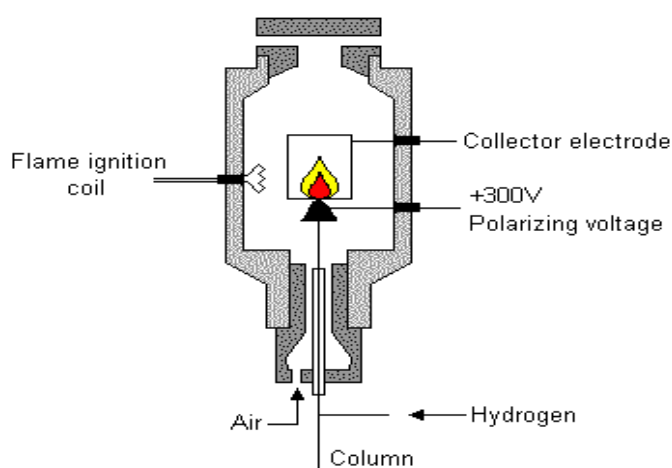


Figura 22. Esquema de las partes básicas de un detector de ionización en llama

Fuente: (Montoya & Páez, 2012)

El detector FID funciona mediante la pirolisis del material que eluye de la columna en una llama de hidrógeno/aire con exceso de oxígeno. Cuando pasan por el detector los compuestos separados por la columna, estos reaccionan en la llama produciendo cationes. Los iones producidos son conducidos mediante un campo eléctrico hacia el colector, donde la corriente generada se amplifica para producir una respuesta (Montoya & Páez, 2012).

El detector de ionización de llama manifiesta una elevada sensibilidad y bajo ruido, por lo tanto es apto para hidrocarburos pues permite detectar los iones de carbono que se forman durante la combustión a alta temperatura. Sumado a la alta sensibilidad, este detector

presenta la característica de poseer un factor de respuesta (en masa) casi idéntico para todos los hidrocarburos. La misma masa de distintos componentes produce la misma intensidad de señal en el detector. Esta característica transforma al FID en un detector de mucha utilidad pues no es necesario conocer la fórmula de un componente para conocer su aporte a la masa total (Montoya & Páez, 2012).

El análisis de la composición química del aceite esencial de *H. racemosum* se complementó utilizando el detector de ionización de llama (FID).

En la corrida cromatográfica se inyectó los hidrocarburos y las nueve muestras del aceite esencial de *H. racemosum*. Las condiciones en las que se inyectaron las muestras y los hidrocarburos se exponen en la figura 23.

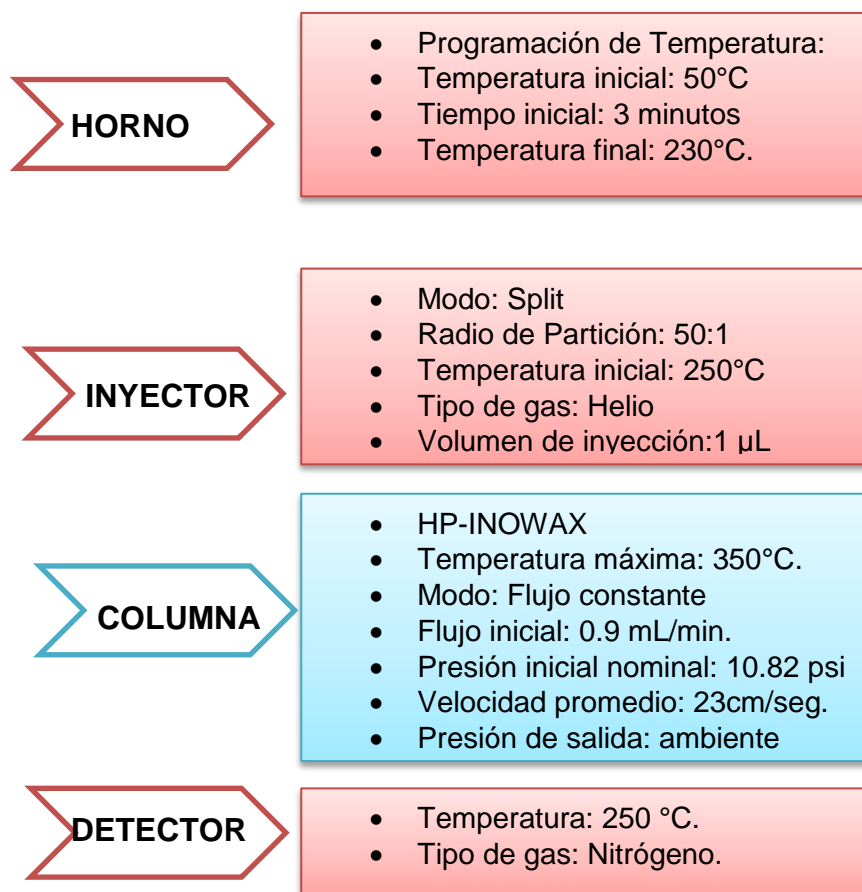


Figura 23. Parámetros operacionales del CG-FID en la columna DB-5ms

Fuente: La Autora

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

En la figura 24, se expone los parámetros bajo los cuales fueron inyectados los hidrocarburos y las 9 muestras de aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*.

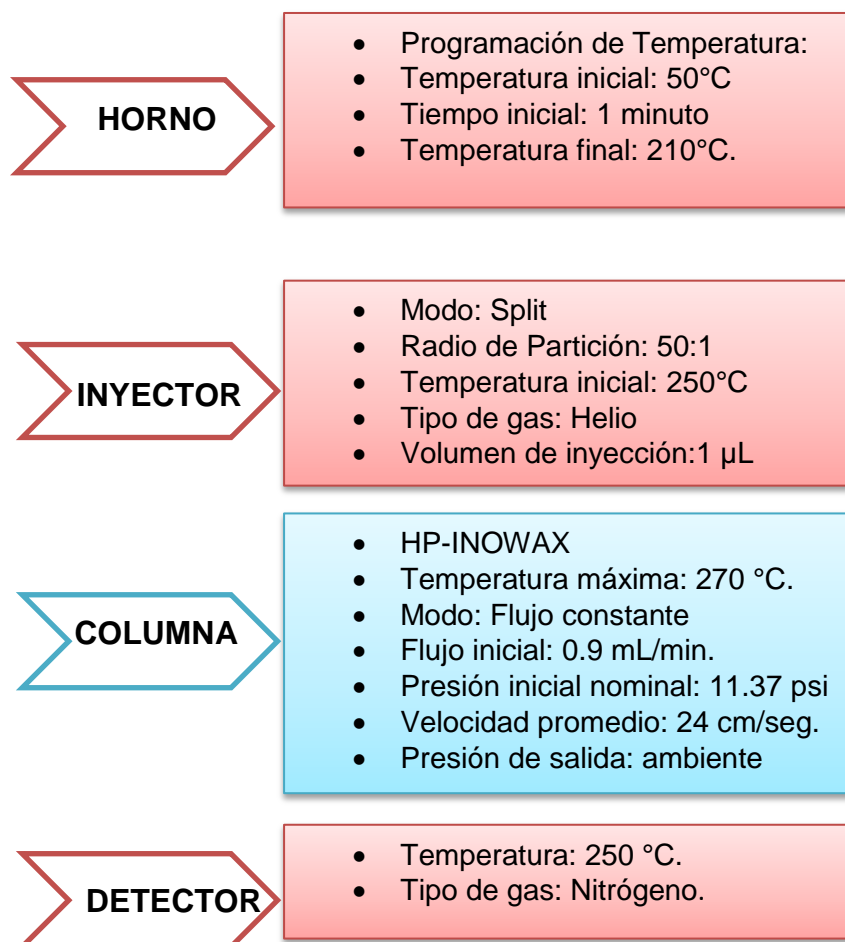


Figura 24. Parámetros operacionales del CG-FID en la columna HP-INNOWAX

Fuente: La Autora

2.4.9. Identificación cuantitativa de los compuestos por CG-FID

Obtenidos los cromatogramas se tomó el tiempo de retención y el área de pico de cada uno de los compuestos químicos identificados en FID y se ajustaron al tiempo de retención de los compuestos detectados en masas a través de la ecuación que resulta de la gráfica que relaciona los tiempos de retención de los hidrocarburos en FID y en masas.

3.5. Evaluación de la actividad biológica

La actividad biológica de los aceites fue evaluada frente a cepas bacterianas y fúngicas mediante el método de microdilución en caldo. Este análisis se basó en la inhibición del crecimiento de microorganismos, mediante diluciones a diferentes concentraciones, reportándose finalmente la Concentración mínima inhibitoria (CMI), del aceite esencial de *H. racemosum*.

2.5.1. Cepas bacterianas y fúngicas

Para evaluar la actividad biológica se utilizaron 9 microorganismos patógenos; siete son cepas bacterianas y dos son cepas fúngicas. Las cepas utilizadas en esta prueba son de American Type Culture Collection (ATCC), son de referencia internacional y forman parte de una batería mínima de cepas que se emplean para este tipo de estudio (Martinez, Molina, & Boucourt, 1997). En la tabla 2 se detallan los microorganismos de prueba.

Tabla 2. Microorganismo de prueba.

MICROORGANISMOS PATÓGENOS		
CEPAS BACTERIANAS		CEPAS FÚNGICAS
<i>Bacterias Gram-negativas</i>	<i>Bacterias Gram-positivas</i>	<i>Hongos esporulados</i>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853 • <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 9997 • <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 • <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427 • <i>Salmonella typhimurium</i> LT2 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 • <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 28185 • <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188

Fuente: American Type Culture Collection

Se emplearon estos microorganismos debido a que tienen un gran impacto en la salud en el ser humano es decir son causantes de una gran mayoría de enfermedades.

2.5.2. Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana se determinó mediante el método de microdilución en caldo y se reportó como la concentración mínima inhibitoria (CMI); la cual se basa en la ausencia de crecimiento bacteriano a una determinada concentración del aceite esencial.

2.5.2.1. Método de microdilución en caldo

Este método posee la ventaja de utilizar volúmenes pequeños de la muestra a analizar y se basa en tres principios fundamentales: el primero, debe existir un medio nutritivo en donde puedan crecer las cepas bacterianas y fúngicas; el segundo tiene que presentar concentraciones estandarizadas tanto de bacterias (5×10^5 UFC/mL) como de hongos (5×10^4 esporas/mL) y finalmente debe existir un inhibidor conocido en este caso el aceite esencial en concentraciones definidas.

2.5.2.1.1. Preparación de la muestra

La muestra de aceite esencial que se va a emplear en este ensayo, debe estar diluida. Para ello se colocó en un vial 20 μL del aceite esencial de *Hedysmum racemosum* y se adicionó 980 μL de Dimetil sulfóxido (DMSO).

2.5.2.1.2. Preparación del cultivo microbiano “Cultivo overnight”

Previo a la preparación del inóculo bacteriano, se realizó los caldos de cultivo específicos para cada cepa bacteriana (Figura 25). Para la siembra en el caldo de cultivo específico, se utilizó 30 μL de cada cepa bacteriana, almacenadas en una reserva criogénica a -80°C . Luego de realizar la siembra de cada cepa se procedió a incubar los medios por 24 horas a 37°C , por esta razón el cultivo se denomina overnight.



Figura 25. Caldos de cultivos para las diferentes cepas bacterianas.

Fuente: La Autora

Las condiciones necesarias y los medios de cultivo para el crecimiento de cada bacteria se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Medios de cultivo y condiciones de incubación necesarias para las bacterias.

CEPA BACTERIANA	MEDIO DE CULTIVO	CONDICIONES DE INCUBACIÓN
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Caldo triptisoya	Temperatura: 37°C Tiempo: 24 horas
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Caldo triptisoya	
<i>Proteus vulgaris</i>	Caldo Muller Hinton	
<i>Escherichia coli</i>	Caldo triptisoya	
<i>Salmonella typhimurium</i>	Caldo Nutritivo Oxoid	
<i>Enterococcus faecalis</i>	Caldo infusión cerebro- corazón	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo triptisoya	

Fuente: American Type Culture Collection.

2.5.2.1.3. Preparación de la suspensión del inóculo bacteriano

Del cultivo overnight incubado la noche anterior se tomó 150-300 µL a un tubo que contenía 7 mL de suero fisiológico estéril ajustando el inóculo a una concentración equivalente a 0,5 en la escala de MacFarland.

De la suspensión anterior se tomó 140 µL y se inoculó en un vial 6,86 mL de Caldo Mueller Hinton, ajustando a una población bacteriana de 2×10^6 UFC/mL. De esta solución final se transfirieron 100 µL a la placa de cultivo para completar un volumen final de 200 µL, de forma que en cada pocillo la concentración final es de 5×10^5 UFC/mL.

2.5.2.1.4. Procedimiento

Para realizar correctamente el método de microdilución en caldo y así determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial fue necesaria la limpieza y desinfección de la cámara de trabajo con alcohol etílico al 70% y la exposición a los rayos ultra violeta por 30 minutos con el objetivo de evitar cualquier tipo de contaminación (Figura 26).



Figura 26: Limpieza y desinfección de la cámara de trabajo

Fuente: La Autora

La prueba se realizó en placas esterilizadas de 96 pocillos, mediante diluciones dobles seriadas; del caldo Mueller Hinton se transfirió 180 μL a cada pocillo de la primera fila de la placa, en los pocillos restantes se colocó 100 μL del mismo caldo. A continuación se colocó 20 μL de la dilución de aceite esencial más DMSO solo a los pocillos de la primera fila de la placa; excepto a los tres últimos pocillos los cuales van a contener: el primero, 180 μL de caldo Mueller Hinton + 20 μL de aceite diluido conocido como control de esterilidad, el segundo, un control negativo con 180 μL de caldo Muller Hinton + 20 μL de DMSO y finalmente en el tercero un control positivo, que es una mezcla de 180 μL de caldo Muller Hinton + 20 μL de Gentamicina de 0,39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para todas las bacterias, excepto para *E. faecalis* y *S. tiphymurium* que se utilizó Gentamicina de 1,95 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Para que el medio y la solución de aceite se homogenicen correctamente, se pipeteó de 15 a 20 veces la solución de todos los pocillos de la primera fila y se tomó 100 μL de la solución homogenizada, luego se diluyó con 100 μL del pocillo siguiente y se continuó este procedimiento hasta obtener 8 diluciones consecutivas; en la última fila de la placa se desechan los 100 μL sobrantes, así la concentración final de cada solución de medio y aceite contenida en cada uno de los pocillos de la placa fue de 1000 a 7,81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 27). El mismo procedimiento fue aplicado con el control positivo, negativo y el control de esterilidad.

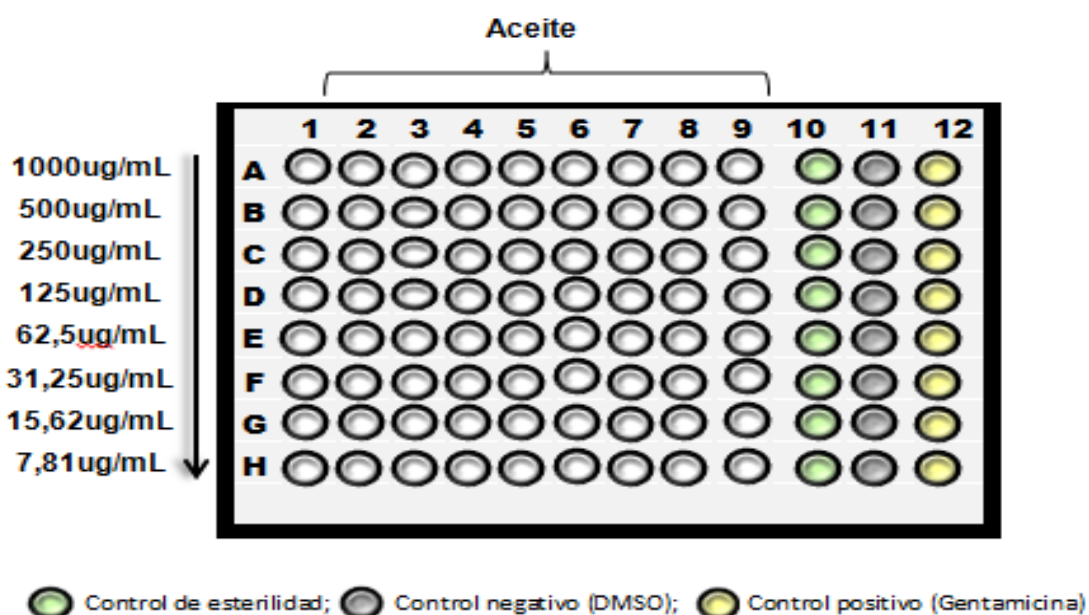


Figura 27. Modelo de Microplaca TC96 para bacterias con las concentraciones del aceite (µg/mL).
Fuente: La Autora

Finalmente, ya preparada la placa de microdilución se procede a inocular todos los pocillos (excepto el pocillo que contiene el control de esterilidad) con 100 µL de la suspensión con el inóculo bacteriano. Completando así un volumen final de 200 µL con una población bacteriana de 5×10^5 UFC/mL, para el control de esterilidad se completó el volumen final con 100 µL de caldo Muller Hinton. Al concluir con la inoculación las placas de microdilución se sellan con parafilm y se incuban a 37°C de 18-24 horas (Figura 28).



Figura 28. Placas de microdilución selladas con parafilm previas a la incubación.
Fuente: La Autora

2.5.3. Actividad antifúngica

Básicamente el procedimiento es el mismo que se utilizó en la Concentración mínima inhibitoria antibacteriana, con unas leves variaciones que se describen en los siguientes ítems.

2.5.3.1. Preparación de la muestra

Se preparó una solución de aceite diluido, tomando 980 μL de DMSO (Dimetil sulfóxido) y 20 μL del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* (Figura 29).

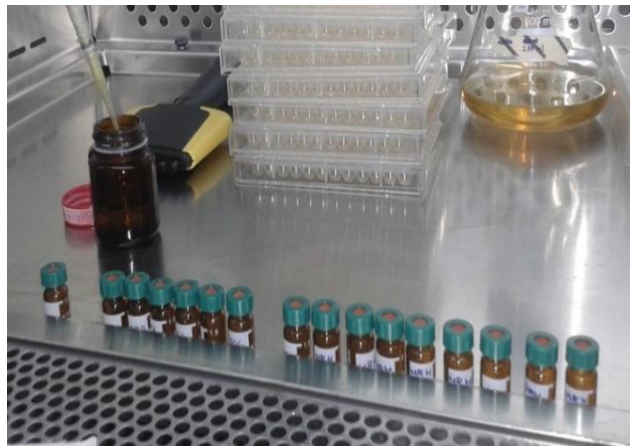


Figura 29: Muestras de aceite diluido con DMSO.

Fuente: La Autora

2.5.3.2. Preparación de la suspensión de los inóculos fúngicos

La suspensión de los microorganismos fúngicos se realizó a partir de cepas almacenadas en reservas criogénicas que se mantienen a una temperatura de -80°C . Se transfirió de las reservas fúngicas 14 μL a un tubo estéril con 7 mL de Caldo Sabouraud, de esta suspensión se tomó 100 μL para completar un volumen final de 200 μL en la placa de cultivo con una concentración de 5×10^4 esporas/mL.

Las condiciones mínimas necesarias para el crecimiento fúngica se detallan en la tabla 4.

Tabla 4. Medio de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada hongo.

Hongo	Condiciones	Medio de cultivo
<ul style="list-style-type: none">Trichophyton mentagrophytes ATCC 28185Trichophyton rubrum ATCC 2818	Temperatura: 28°C Tiempo de incubación: 72 - 96 horas.	Caldo Sabouraud

Fuente: American Type Culture Collection.

2.5.3.3. Procedimiento

Se empleó el mismo procedimiento de dilución seriada utilizado para las bacterias, diferenciándose en la concentración final del inóculo; en hongos esporulados es de 5×10^4 esporas/mL y los controles; el positivo que es una solución de 180 μ L de caldo Sabouraud más 20 μ L de Itraconazol de 0,39 μ g/mL el control negativo que consta de 180 μ L de caldo Sabouraud + 20 μ L de DMSO y finalmente Control de esterilidad, que contiene 180 μ L de caldo Sabouraud + 20 μ L de aceite diluido. Cuando las placas de microdilución están inoculadas totalmente, se sellan las cajas con parafilm y se incuban a 28°C por 96 horas.

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

Una vez retiradas las placas de microdilución de la incubadora, se observa minuciosamente cada caja utilizando luz reflejada; se comienza examinando el control de esterilidad para descartar cualquier tipo de contaminación, ya que al existir contaminación la prueba no puede ser interpretada y debe ser repetida.

Por otro lado el control positivo nos indica que si habido un crecimiento adecuado, ya sea de las bacterias o los hongos en la placa de microdilución. El crecimiento en este pocillo se nota como turbidez o un pellet de > 2 mm.

Finalmente en el control negativo no se debe evidenciar ningún rastro de crecimiento, por el contrario debe estar claro y sin turbidez. Para determinar en qué punto se encuentra la concentración mínima inhibitoria de una muestra, es decir la concentración más baja a la que puede actuar el aceite como antimicrobiano, se debe leer el pocillo en el cual se distinga turbidez del medio. Es un proceso manual sin ayuda de ningún aparato óptico.

2.6. Evaluación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*, se evaluó mediante dos métodos espectrofotométricos; ABTS+ y DPPH. Las mediciones se determinaron según la absorbancia que leía el equipo de cada muestra para ello se utilizó un espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS Scanning 333907. Las longitudes de onda empleadas en cada método fueron 734 nm y 515 nm respectivamente.

2.6.1. Preparación de las muestra

Para realizar el análisis de la muestra mediante los métodos anteriormente mencionados, se procedió a colocar en un vial 115 μL de cada una de las 9 muestras de aceite esencial hasta obtener un volumen final de 1000 μL .

Posteriormente se procedió a realizar diluciones del aceite esencial, la primera dilución que se realizó fue partiendo de una concentración máxima inicial de 100 ppm, hasta llegar a una concentración mínima final de 0 ppm.

Los volúmenes respectivos de cada dilución deben ser los necesarios para analizar cada muestra por triplicado. En la tabla 5, se explica cómo se realizó cada dilución, cabe destacar que el volumen final de cada dilución es de 2000 μL .

Tabla 5. Volumen necesario para cada dilución.

Volumen necesario para cada dilución.	
Concentración	Volumen de cada dilución
Concentración 1 (100 ppm)	1800 μL MeOH + 200 μL de aceite esencial
Concentración 2 (50 ppm)	1800 μL MeOH + 200 μL de concentración 1
Concentración 3 (25 ppm)	1800 μL MeOH + 200 μL de concentración 2
Concentración 4 (12,5 ppm)	1800 μL MeOH + 200 μL de concentración 3
Concentración 5 (5 ppm)	1200 μL MeOH + 800 μL de concentración 4
Concentración 6 (0 ppm)	2000 μL MeOH

Fuente: Investigación Experimental.

2.6.2. Método ABTS+

El método ABTS+ [ácido 2,2-anizobis-(3-etilbenzotiozaln-6 sulfónico)], consiste en formar un radical catiónico ABTS+ (cromóforo verde) basándose en la acción oxidativa de peroxidasas u oxidasas sobre ABTS+ (Barrero. et al., 2004).

El radical ABTS+ presenta una absorbancia a una longitud de onda de 734 nm. Esta propiedad da la posibilidad de evitar interferencias generadas por cromógenos del aceite esencial. La absorbancia característica de este radical que posee un color verde intenso, disminuye en presencia de un antioxidante u otro radical. Es posible, por tanto, cuantificar la capacidad captadora de radicales libres que presenten los aceites esenciales mediante la determinación del grado de decoloración que provocan a una solución de ABTS+ (Barrero. et al., 2004).

2.6.2.1. Solución patrón y de trabajo

Para realizar la solución patrón se pesó 0,1015 g de ABTS+ y 0,01757 g de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$), luego se aforó cada uno de los reactivos a 25 mL de agua destilada. Estos dos reactivos se mezclaron y se dejó reposar por 12 horas protegidos de la luz.

Transcurridas las 12 horas de reposo, se tomó una alícuota de 2,16 mL aforado a 127,84 mL con metanol obteniéndose la solución de trabajo, posteriormente se procedió a medir la absorbancia a una longitud de onda de 734 nm, tomando en cuenta que se ajustó la solución de trabajo hasta obtener una lectura de $1,1 \pm 0,02$. Si la lectura de la absorbancia es mucho menor al resultado que se desea obtener se debe ir añadiendo más solución de trabajo, si por el contrario la lectura de la absorbancia es mayor a la esperada se debe añadir metanol. Previo a lectura de la absorbancia de la solución de trabajo se procedió a encerar el equipo con metanol.

2.6.2.2. Curva estándar Trolox.

Para realizar la solución estándar se utilizó Trolox o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico que es un análogo sintético de la vitamina E, el cual es el patrón de referencia utilizado para expresar la actividad antioxidante del aceite esencial como TEAC que es la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (Conde., Rueda., & Patiño., 2012).

Se pesó 0.025 g de Trolox y se aforó a 100 mL de metanol, de esta solución se tomó alícuotas de 0; 250; 1500; 3000; 4500 y 8000 μL y se adicionó 10 mL de metanol. Se tomó 150 μL de cada alícuota y 2850 μL de la solución de trabajo dejándolo x 2 horas en la oscuridad, transcurrido ese tiempo se procedió a leer la absorbancia a 734 nm. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada concentración de Trolox.

2.6.2.3. Lectura de muestras.

Para determinar si el aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* posee capacidad antioxidante, se debe evaluar cada muestra con suma precisión, tanto para cada dilución que se realizó anteriormente del aceite esencial como para cada alícuota de Trolox.

Como se mencionó anteriormente se preparó una solución concentrada de 100 ppm con soluciones diluidas a diferentes concentraciones que van desde 50, 25, 12,5, 5 y 0 ppm. De cada una de las soluciones preparadas anteriormente se tomó 150 μL y se llevó a tubos de ensayo rotulados previamente, donde se le adicionó 2850 μL de la solución ABTS+ dando un volumen de 3 mL, se dejó reposar por dos horas en oscuridad y se midió la absorbancia a 734 nm. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada concentración de aceite esencial (Figura 30).



Figura 30. Muestras del aceite *Hedyosmum racemosum*, analizadas mediante método ABTS+.

Fuente: Investigación Experimental.

2.6.3. Método DPPH+

Este método se basa en la reducción del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) por los compuestos antioxidantes de la muestra del aceite esencial. El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando la muestra que se añade posee capacidad antioxidante. La decoloración del radical se determina a 515 nm y la cuantificación se realiza por lo general, empleando soluciones patrón de Trolox. Aparentemente los compuestos que posean moléculas más pequeñas con mejor accesibilidad al centro activo del radical poseen mayor afinidad por este método (Conde et al., 2012).

2.6.3.1. Solución patrón y de trabajo.

La solución patrón se realizó pesando 0.024 g de reactivo de DPPH y se aforó a 100 mL de metanol, de esta solución se tomó 23.63 mL y se adicionó 106,37 mL de metanol obteniéndose la solución de trabajo; se midió la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm ajustando hasta obtener una lectura de $1,08 \pm 1,12$. Si la lectura de la absorbancia es mayor se ajusta añadiendo metanol y si por el contrario es menor se ajusta añadiendo más solución de trabajo.

2.6.3.2. Curva estándar Trolox.

Como ya se mencionó previamente Trolox fue utilizado como el estándar de referencia para determinar la capacidad antioxidante del aceite esencial para ambos métodos.

Para realizar el estándar de Trolox para de DPPH se pesó 0,025 g de reactivo de Trolox y se aforó a 100 mL con metanol. De esta solución se tomaron alícuotas de 0, 250, 1500, 3000, 4500, 6000 y 8000 μL y se aforó a 10 mL con metanol. Se tomó 150 μL de cada alícuota y 2850 μL de la solución de trabajo de DPPH, se dejó reposar 24 horas en oscuridad y se procedió a leer la absorbancia a 734 nm. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada concentración de Trolox.

2.6.3.3. Lectura de muestras.

Al igual que al realizar la parte experimental del método de ABTS+, en este método también se utilizó muestras diluidas a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* y diferentes concentraciones del estándar Trolox.

Cabe destacar que la parte experimental se realizó por triplicado de cada muestra diluida. De cada muestra se transfirió 150 µL a un vial color ámbar ya que debe estar protegido de la luz. Este vial contiene también 2850 µL de la solución de trabajo de DPPH. El volumen final de cada vial debe ser de 3 mL, estos viales se dejan reposar por 24 horas en la oscuridad y posteriormente se lee la absorbancia de cada muestra a 734 nm (Figura 31).



Figura 31. Muestras del aceite *Hedyosmum racemosum*, analizadas mediante el método DPPH

Fuente: Investigación Experimental

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

Las absorbancias determinadas mediante el método ABTS+ y DPPH, de cada muestra de aceite esencial evaluada a diferentes concentraciones, permiten calcular el porcentaje de inhibición empleando la fórmula de la figura 32.

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

Figura 32. Fórmula utilizada para calcular porcentaje de inhibición.

Fuente: (Conde. et al., 2012)

Con los valores obtenidos de % Inh, se calcula el valor de la concentración media inhibitoria (CI_{50}) de la muestra. El CI_{50} de cada aceite se determinó realizando una gráfica de concentración (ppm) vs. Porcentaje de inhibición (% Inh), obteniendo así, una ecuación para la recta y calculando luego la concentración para la cual el porcentaje de inhibición es del 50%. Para obtener la ecuación necesaria para calcular CI_{50} , se utilizó el programa OriginPro versión 8E.

En ambos métodos (ABTS+ y DPPH) se utilizó como estándar el Trolox, cuya capacidad antioxidante se evaluó en las mismas condiciones de trabajo de las muestras.

Al igual que las muestras de aceite esencial se determinó el CI_{50} del estándar Trolox a partir de la gráfica lineal de concentración vs % de inhibición.

El CI_{50} del aceite y del Trolox nos sirve para expresar la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC: μMOL de Trolox/g de AE) a través de la fórmula de la figura 33.

$$TEAC = \left\{ \frac{CI_{50} TROLOX \left(\frac{\mu\text{MOL}}{\text{mL}} \right)}{CI_{50} MUESTRA \left(\frac{\text{gr}}{\text{mL}} \right)} \right\}$$

Figura 33. Fórmula para calcular TEAC.

Fuente: (Conde. et al., 2012)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Humedad

En la tabla 6 se presenta el porcentaje promedio de la humedad de las tres recolecciones realizadas. Cabe recalcar que por cada recolección se realizó tres destilaciones.

Tabla 6. Porcentaje de Humedad de la materia vegetal.

HUMEDAD				
Recolección	H (%)	\bar{X}	σ	CV
HRH1	59	58	1,20	0,02
HRH2	57			
HRH3	59			

HRH: *Hedyosmum racemosum* Hembra: HRH1 Primera recolección; HRH2: Segunda recolección; HRH 3 Tercera Recoleccion. H(%): Humedad promedio por cada recolección; \bar{X} : promedio de todas las recolecciones; σ : Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación.

Fuente: Investigación Experimental.

La materia vegetal recolectada tuvo una humedad promedio de 58%, sin embargo se puede apreciar que existe una pequeña variación en la humedad de la materia vegetal en las diferentes recolecciones. La variabilidad de estos resultados se puede atribuir a las condiciones climáticas, el suelo, el manejo de nutrientes y el desarrollo de la planta al momento de la recolección (Margulis & Sagan, 2012), puesto que fue recolectada en distintos períodos de tiempo.

3.2. Rendimiento

El rendimiento del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* se detalla en la tabla 7, el porcentaje de rendimiento medio para cada recolección resulta de la media de las tres repeticiones. Se expone un promedio general junto la desviación estándar y coeficiente de variación

Tabla 7. Rendimiento en %(p/v) del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*.

RENDIMIENTO				
Recolección	R (%)	\bar{X}	σ	CV
HRH1	0,26	0,24	0,03	0,14
HRH2	0,26			
HRH3	0,20			

HRH: *Hedyosmum racemosum* Hembra: **HRH1** Primera recolección; **HRH2:** Segunda recolección; **HRH 3** Tercera Recoleccion. **R (%)**: Rendimiento promedio por cada recolección; \bar{X} : promedio de todas las recolecciones; σ : Desviación estándar; **CV**: Coeficiente de variación.

Fuente: Investigación Experimental

De los porcentajes de rendimiento expuestos en la tabla anterior, el rendimiento más alto 0,26% se obtuvo a partir de 2 kg de materia vegetal con un volumen de 6 mL de aceite esencial, el rendimiento más bajo obtenido fue de 0,20% a partir de 1,9 Kg con 4 mL de aceite. Cabe mencionar que existen factores que influyen en el rendimiento del aceite esencial tales como el estado fenológico de la planta y las condiciones en las se realizó la destilación como por ejemplo la cantidad de materia vegetal, cantidad de agua, temperatura y presión (Sandoval, 1999).

Según la categorización propuesta por el organismo de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED), el valor del rendimiento de *H. racemosum* es bajo dado que valores menores a 5 mL/kg los considera bajos, valores entre 5 mL/kg y 10 mL/kg intermedios, y valores superiores a 10 mL/kg altos (Molares, González, Ladio, & Castro, 2009).

La determinación del rendimiento es particularmente utilizada como un criterio más para la selección de especies aromáticas potencialmente comercializables, sin embargo la misma debe analizarse en conjunto con otras características del aceite esencial, como la originalidad del aroma, composición química y efectos farmacológicos (Molares et al., 2009).

3.3. Propiedades físicas del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*

Las propiedades físicas de los aceites esenciales están relacionadas con la diversidad de sus constituyentes, convirtiéndose en un instrumento rápido de identificación y evaluación del grado de pureza o del origen del producto, puesto que se trata de su huella digital.

El aceite esencial de *H. racemosum* es un líquido viscoso translúcido que presenta un olor acre-cítrico-dulce.

3.3.1 Densidad del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*

La tabla 8 muestra la densidad promedio de las tres destilaciones que se realizaron por cada recolección. El aceite esencial de mayor densidad fue 0,9074 g/cm³, y el de menor de 0,8984 g/cm³. La densidad promedio del aceite esencial obtenida de las tres recolecciones es de 0,9038 g/cm³.

Tabla 8. Densidad media del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*.

Recolección	Densidad (g/cm ³)	\bar{X}
HRH1	0,9056	0,9038
HRH2	0,9074	
HRH3	0,8984	
HRH: <i>Hedyosmum racemosum</i> Hembra: HRH1 Primera recolección; HRH2: Segunda Recoleccion; HRH 3 Tercera Recoleccion; \bar{X} : promedio de todas las recolecciones.		

Fuente: Investigación Experimental.

La mayoría de los aceites esenciales al estar compuestos fundamentalmente por terpenos y derivados, tienen una densidad menor que la del agua (densidad menor que 1g/cm³), situación que se aplica al aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*. La densidad es un parámetro fácil de obtener y permite distinguir un aceite esencial auténtico de esencias sintéticas comunes (Ortuño, 2006)

3.3.2. Índice de refracción del aceite esencial

Los índices de refracción se detallan en la tabla 9, estos valores corresponden a la media de las tres destilaciones obtenidas por cada recolección realizada. El valor más alto del índice de refracción fue de la tercera recolección (1,4904) el más bajo fue de la segunda (1,4870).

Tabla 9. Índice de refracción del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*

Índice de Refracción				
Recolecciones	Índice de refracción (nD)	\bar{X}	σ	CV
HRH1	1,4875	1,4883	0,002	0,001
HRH2	1,4870			
HRH3	1,4904			
<p>HRH: <i>Hedyosmum racemosum</i> Hembra: HRH1 Primera recolección; HRH2: Segunda Recoleccion; HRH 3 Tercera Recoleccion; \bar{X}: promedio de todas las recolecciones; σ: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación.</p>				

Fuente: Investigación Experimental

El promedio general de los índices de refracción de las muestras de aceite esencial fue 1,4883. Este parámetro es característico de cada aceite y que cambia si este se diluye o se mezcla con otras sustancias (Ortuño, 2006).

3.4. Composición química del aceite esencial de *Hedyosmun racemosum*

3.4.1. Análisis cualitativo y cuantitativo

Se determinó la composición química del aceite de *H. racemosum* mediante cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-EM) y al detector de ionización en llama (CG-FID), utilizando las columnas DB-5ms y HP-INNOWAX.

En la figura 34, se observan los perfiles cromatográficos del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* obtenidos en la columna DB-5ms y HP-INNOWAX mediante la técnica de CG-EM acorde a los parámetros operacionales descritos en la metodología.

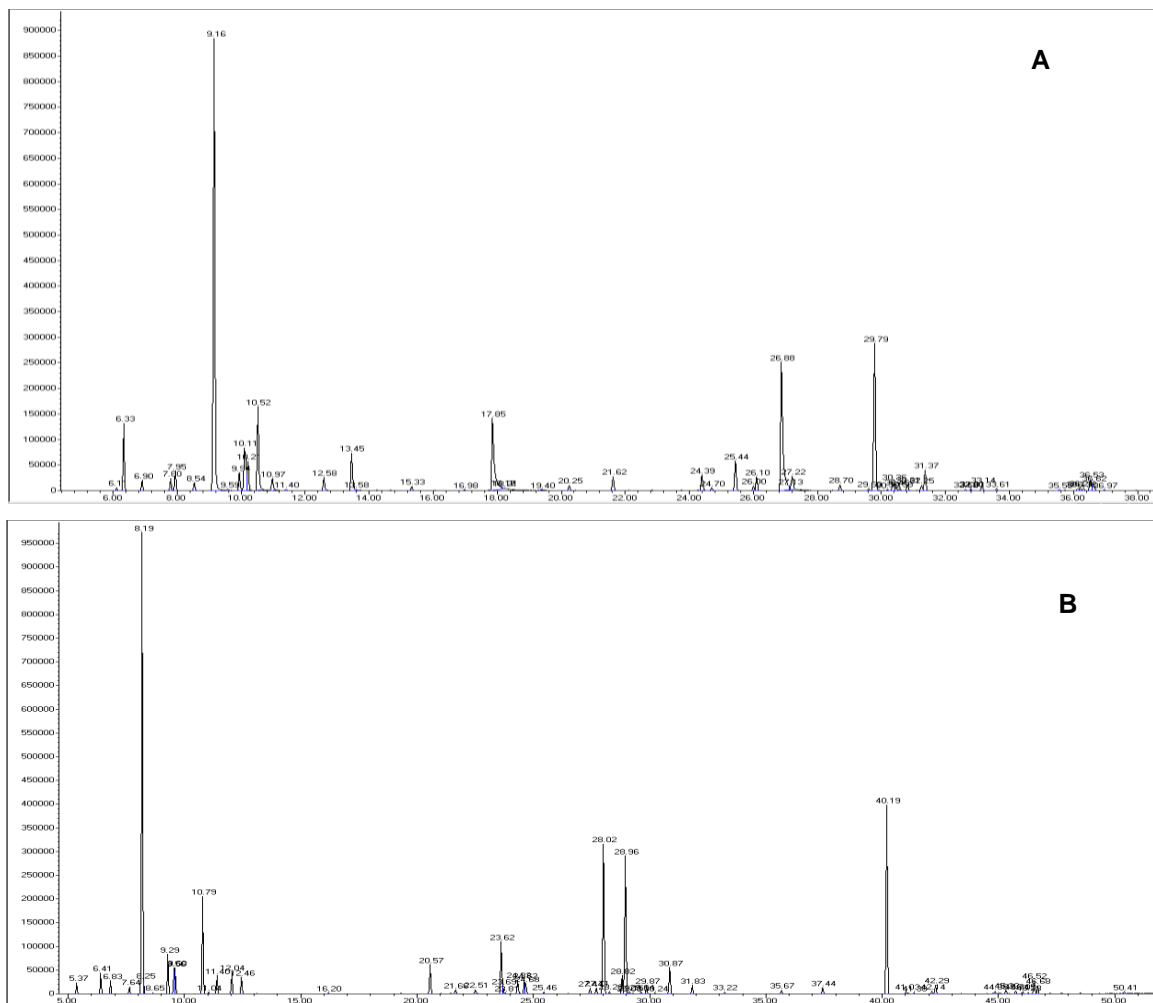


Figura 34. Perfil cromatográfico típico del aceite esencial extraído de especímenes hembra de *H. racemosum* obtenido en la columna DB-5ms (A) y HP-INNOWAX (B).

Fuente: Investigación Experimental.

Cada pico representa un compuesto de área proporcional a su concentración. Los cromatogramas obtenidos presentan un sinnúmero de picos muy próximos resultando en cierta forma compleja la identificación en su totalidad, de modo que para una identificación mucho más fiable de los compuestos presentes en las muestras se integraron los picos cromatográficos. En los cromatogramas (figura 34), se observan los picos integrados considerados para su identificación.

En el análisis cualitativo, la identificación de los componentes volátiles se la realizó comparando los índices de Kovats (IK) determinados experimentalmente en las dos columnas (apolar y polar) para los compuestos analizados frente a los IK reportados en la literatura. Los índices de retención experimentales se determinaron en relación a la serie homóloga de alcanos (C10 a C25). A su vez cada compuesto detectado posee su respectivo

espectro de masas el cual fue comparado con los espectros que proporciona la base de datos del equipo biblioteca Wiley.

En la tabla 10, se detallan los compuestos químicos identificados del aceite esencial de *H. racemosum* en las columnas DB-5ms y HP-INNOWAX; los mismos que están organizados de acuerdo al orden de elución en la columna DB-5ms, resaltando los compuestos que presentan mayores áreas. Cada compuesto presenta su respectivo índice de Kovats calculado y el índice reportado en la literatura; junto a la cantidad relativa que corresponde al porcentaje de participación de cada compuesto para la primera (HRH1), segunda (HRH2) y tercera recolección (HRH3) se reporta el área promedio por compuesto, la desviación estándar y el coeficiente de variación. El porcentaje de cantidad relativa de los compuestos, reportada por cada recolección es el resultado del promedio de las áreas de cada compuesto identificado en los aceites obtenidos de las tres destilaciones realizadas por recolección.

Tabla 10. Composición Química de *Hedyosmum racemosum*

No	COMPUESTOS	DB-5ms-MS ^a								HP-INNOWAX-MS ^c							
		IK ^{cal}	IK ^{ref}	% DE CANTIDAD RELATIVA			\bar{X}	σ	C.V.	IK ^{cal}	IK ^{ref}	% DE CANTIDAD RELATIVA			\bar{X}	σ	C.V.
				HRH1 ^b	HRH2 ^b	HRH3 ^b						HRH1 ^b	HRH2 ^b	HRH3 ^b			
1	α -thujene	928	924 ^d	0,14	0,16	0,16	0,15	0,01	0,08	1038	1035 ^g	0,15	0,19	0,19	0,18	0,03	0,15
2	α -pinene	933	934 ^d	4,16	5,82	6,31	5,43	1,13	0,21	1035	1032 ^g	3,89	5,29	5,91	5,03	1,04	0,21
3	Camphene	947	946 ^d	0,60	0,90	1,75	1,08	0,60	0,55	1066	1066 ^h	0,57	0,85	1,63	1,02	0,55	0,54
4	Sabinene	969	969 ^d	0,71	0,79	1,25	0,92	0,29	0,32	1114	1129 ^h	0,72	0,82	1,27	0,93	0,29	0,31
5	β -Pinene	973	974 ^d	1,33	1,72	2,18	1,74	0,43	0,24	1100	1118 ^g	1,26	1,63	2,07	1,65	0,41	0,25
6	Myrcene	988	988 ^d	0,51	0,59	0,51	0,54	0,05	0,09	1160	1160 ^l	0,57	0,37	0,52	0,49	0,10	0,20
7	α -Phellandrene	1003	1002 ^d	27,45	28,80	23,15	26,47	2,95	0,11	1158	1165 ^l	25,08	24,90	21,72	23,90	1,89	0,08
8	3- δ -Carene	1013	1008 ^d	0,18	0,11	0,14	0,05	0,25	1140	1148 ^l	0,57	1,17	0,87	0,43	0,49
9	p-Cymene	1021	1020 ^d	0,91	1,36	1,19	1,15	0,23	0,20	1268	1280 ^l	0,96	1,45	1,27	1,23	0,25	0,20
10	Limonene	1024	1024 ^d	3,49	3,55	3,04	3,36	0,28	0,08	1194	1202 ^l	2,10	2,19	1,93	2,07	0,13	0,06
11	1,8-Cineole	1027	1026 ^d	1,86	2,38	2,55	2,26	0,36	0,16	1202	1213 ^l	1,57	2,09	3,27	2,31	0,87	0,38
12	(Z)- β -Ocimene	1034	1032 ^d	5,00	4,30	3,46	4,25	0,77	0,18	1235	1232 ^l	5,02	4,35	3,57	4,31	0,73	0,17
13	(E)- β -Ocimene	1044	1044 ^d	0,98	0,78	1,27	1,01	0,25	0,24	1251	1254 ^k	1,07	0,92	1,43	1,14	0,26	0,23
14	γ -Terpinene	1054	1054 ^d	0,10	0,11	0,10	0,01	0,52	1241	1244 ^l	0,10
15	Terpinolene	1081	1086 ^d	1,59	3,37	2,48	1,26	0,76	1279	1290 ^l	1,59	3,17	2,38	1,12	0,47
16	Linalool	1100	1095 ^d	3,66	4,39	2,47	3,51	0,97	0,28	1559	1553 ^g	4,38	5,19	2,97	4,18	1,13	0,27
17	Camphor	1141	1141 ^d	0,37	0,67	0,87	0,64	0,25	0,40	1510	1532 ^g	0,36	0,66	0,85	0,62	0,25	0,40
18	Terpinen-4-ol	1177	1174 ^d	0,14	1606	1605 ^m	0,18	0,23	0,20	0,04	0,18
19	α -terpineol	1194	1186 ^d	0,20	0,12	0,16	0,05	0,33	1704	1706 ^l	0,29	0,41	0,32	0,34	0,07	0,19
20	Estragole	1196	1195 ^d	11,48	14,46	24,98	16,97	7,10	0,42	1674	1675 ⁿ	13,55	16,17	24,49	18,07	5,71	0,32
21	citronellol	1230	1223 ^d	0,30	1778	1772 ⁿ	0,60	0,89	0,41	0,64	0,24	0,38
22	Linalool acetate	1249	1254 ^d	0,30	0,22	0,18	0,24	0,06	0,26	1561	1565 ^g	0,21
23	Bornyl acetate	1280	1284 ^d	1,02	1,17	3,10	1,76	1,16	0,66	1577	1579 ^g	0,96	1,13	2,92	1,67	1,09	0,65
24	α -Terpinyl acetate	1343	1346 ^d	1,20	1,20	1,34	1,25	0,08	0,07	1695	1709 ^l	1,28	1,32	1,45	1,35	0,09	0,07
25	Citronellyl acetate	1350	1350 ^d	0,18	0,19	0,10	0,16	0,05	0,31	1666	1654 ^l	0,30	0,37	0,22	0,30	0,07	0,24
26	α -Copaene	1367	1374 ^d	2,42	1,36	1,02	1,60	0,73	0,46	1482	1487 ^g	2,22	1,35	1,00	1,52	0,63	0,41
27	β -Cubebene	1380	1387 ^d	0,35	0,18	0,20	0,24	0,09	0,39	1531	1544 ^h	0,30	0,19	0,19	0,23	0,06	0,28
28	β -Elemene	1383	1389 ^d	1,01	0,60	0,56	0,72	0,25	0,34	1585	1586 ^l	0,98	0,68	0,61	0,76	0,19	0,26
29	Methyl Eugenol	1401	1403 ^d	8,72	7,21	2,03	5,99	3,51	0,59	2025	2030 ^l	10,13	8,62	3,36	7,37	3,55	0,48
30	(E)- β -Caryophyllene	1409	1417 ^e	1,34	1,07	0,55	0,99	0,40	0,41	1586	1592 ^l	0,60	0,36	0,19	0,39	0,21	0,53
31	α -Humulene	1445	1452 ^d	0,41	0,23	0,20	0,28	0,11	0,41	1659	1660 ^l	0,36	0,26	0,21	0,28	0,08	0,28
32	γ -Muuroolene	1467	1478 ^d	0,16	0,11	0,13	0,14	0,03	0,20	1681	1681 ^k	0,18	0,17	0,18	0,18	0,01	0,04
33	D-Germacrene	1472	1484 ^d	12,97	8,39	9,67	10,34	2,36	0,23	1699	1704 ^g	11,96	7,65	8,78	9,46	2,23	0,24
34	Bicyclogermacrene	1486	1494 ^d	0,77	0,59	0,71	0,69	0,09	0,13	1724	1727 ^l	0,61	0,53	0,61	0,58	0,05	0,08

Nº	COMPUESTOS	DB-5ms-MS ^a								HP-INNOWAX-MS ^c							
		IK ^{cal}	IK ^{ref}	% DE CANTIDAD RELATIVA			\bar{X}	σ	C.V.	IK ^{cal}	IK ^{ref}	% DE CANTIDAD RELATIVA			\bar{X}	σ	C.V.
				HRH1 ^d	HRH2 ^d	HRH3 ^d						HRH1 ^d	HRH2 ^d	HRH3 ^d			
35	α -amorphene	1488	1483 ^d	0,17	0,12	0,15	0,04	0,24
36	α - Muurolene	1491	1500 ^d	0,18	0,11	0,15	0,15	0,04	0,25	1718	1716 ^k	0,17	0,12	0,15	0,15	0,02	0,14
37	Germacrene A	1497	1508 ^d	0,45	0,24	0,24	0,31	0,12	0,39
38	γ -cadidene	1507	1513 ^d	0,29	0,18	0,19	0,22	0,06	0,28
39	δ -Cadinene	1511	1522 ^d	1,69	1,04	0,99	1,24	0,39	0,32	1752	1748 ^k	2,06	1,41	1,30	1,59	0,41	0,26
40	B-Germacrene	1547	1559 ^d	0,15	1818	1809 ^o	0,15
41	spathulenol	1568	1577 ^d	0,10
42	β -Eudesmol	1645	1649 ^d	0,69	0,49	0,35	0,51	0,17	0,34	2230	2257 ^g	0,72	0,61	0,42	0,58	0,15	0,26
43	t-Muurolol	1647	1640 ^d	0,44	0,33	0,29	0,35	0,08	0,22	2203	2209 ^p	0,16	0,14	0,15	0,01	0,08
44	β -Phellandrene	1203	1210 ⁱ	1,22	1,14	0,18	0,05	0,05
45	Germacrene-D-4-OL	2051	2069 ^g	0,11
46	cis- α -Copaen-8-ol	2091	2078 ^o	0,41	0,34	0,31	0,36	0,05	0,15
47	α -Cadinol	2235	2228 ⁱ	0,34	0,33	0,28	0,32	0,03	0,09
*Total identificado:							99,67	*Total identificado:							99,96		

a=compuestos ordenados de acuerdo al orden de elución en la columna DB-5ms ; b =% promedio calculados en base al % del área de los picos reportados en la columna DB-5ms y HP-INNOWAX respectivamente; c =compuestos identificados solo en la columna HP-INNOWAX; *= Sumatoria del porcentaje relativo de los compuestos identificados en ambas columnas; **HRH1**: Aceites de la primera recolección; **HRH2**:Aceites de la segunda recolección; **HRH3**: Aceites de la tercera recolección; \bar{X} =Promedio σ = desviación estándar; CV= Coeficiente de variación;

IK^{cal} = Índice de Kovats calculado.

IK^{ref} = Índice de Kovats reportado en la literatura: ^d ref. 1; ^e ref. 2; ^f ref. 3; ^g ef. 4; ^h ref. 5; ⁱ ref. 6; ^j ref. 7; ^k ref. 8; ^l ref.9; ^m ref. 10; ⁿ ref. 11; ^{n̄} ref. 12; ^o ref. 13; ^p ref. 14. ver anexo (V)

Fuente: Investigación Experimental.

En la figura 35 se puede observar una diferencia en los porcentajes de los compuestos mayoritarios en las tres recolecciones (HRH1, HRH2, HRH3), del aceite esencial en la columna DB5-MS. Según Rueda et al 2011, esto se puede deber a la época de la recolección, estado fenológico, el lugar geográfico o por pequeños cambios genéticos (Rueda, Parada, & Lugo, 2011).

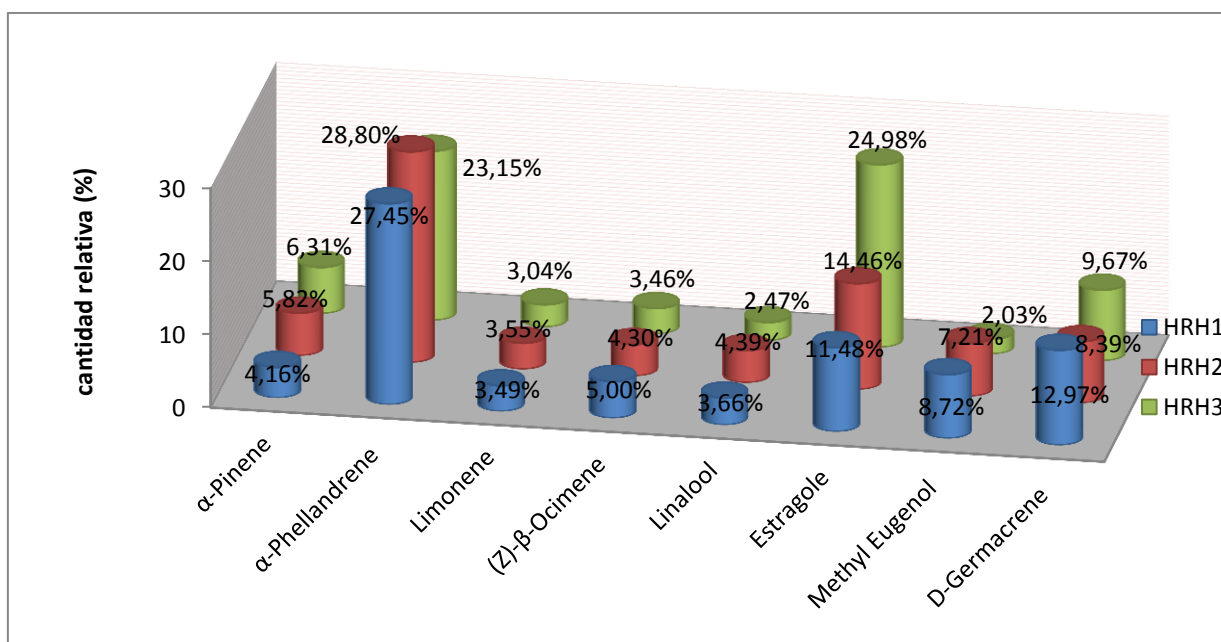


Figura 35. Compuestos mayoritarios identificados en las tres recolecciones del aceite esencial de *H. racemosum* en la columna DB-5ms

Fuente: Investigación Experimental.

El análisis cuantitativo se basó en la comparación del porcentaje de cantidad relativa de los picos de los analitos detectados en FID con el porcentaje de cantidad relativa de los picos de los compuestos identificados en EM, tanto el análisis cualitativo y cuantitativo confirmaron la presencia en el aceite esencial analizado de los compuestos expuestos en la tabla 11, en la cual se presentan los porcentajes de cantidad relativa por recolección, el promedio y la desviación estándar.

Tabla 11. Comparación de la cantidad relativa (%) de los compuestos químicos del aceite esencial por CG-EM y CG-FID.

COMPUESTOS	DB-5ms										HP-INNOWAX									
	%CANTIDAD RELATIVA						MS		FID		%CANTIDAD RELATIVA						MASAS		FID	
	HRH1		HRH2		HRH3						HRH1		HRH2		HRH3					
	MS	FID	MS	FID	MS	FID	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	MS	FID	MS	FID	MS	FID	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ
α -thujene	0,14	0,19	0,16	0,23	0,16	0,16	0,15	0,01	0,19	0,04	0,15	0,19	0,19	0,23	0,19	0,22	0,18	0,03	0,21	0,02
α -pinene	4,16	4,67	5,82	6,31	6,31	6,97	5,43	1,13	5,98	1,19	3,89	4,25	5,29	5,72	5,91	6,50	5,03	1,04	5,49	1,15
Camphene	0,60	0,51	0,90	1,05	1,75	1,97	1,08	0,60	1,18	0,74	0,57	0,67	0,85	0,95	1,63	1,83	1,02	0,55	1,15	0,61
Sabinene	0,71	0,80	0,79	0,99	1,25	1,49	0,92	0,29	1,09	0,35	0,72	0,84	0,82	0,93	1,27	1,43	0,93	0,29	1,07	0,31
β -Pinene	1,33	1,56	1,72	2,12	2,18	2,67	1,74	0,43	2,12	0,55	1,26	1,54	1,63	1,92	2,07	2,47	1,65	0,41	1,98	0,47
Myrcene	0,51	0,77	0,59	0,89	0,51	0,76	0,54	0,05	0,81	0,07	0,57	0,11	0,37	0,15	0,52	1,17	0,49	0,10	0,48	0,60
α -Phellandrene	27,45	28,74	28,80	28,49	23,15	23,83	26,47	2,95	27,02	2,77	25,08	26,61	24,90	27,00	21,72	23,39	23,90	1,89	25,67	1,98
3- δ -Carene	0,18	1,58	0,11	0,12	0,14	0,05	0,85	1,03	0,57	0,70	1,17	1,32	0,87	0,43	1,01	0,44
p-Cymene	0,91	0,77	1,36	0,87	1,19	0,78	1,15	0,23	0,80	0,06	0,96	0,93	1,45	1,29	1,27	1,18	1,23	0,25	1,13	0,18
Limonene	3,49	2,60	3,55	3,45	3,04	2,89	3,36	0,28	2,98	0,43	2,10	2,49	2,19	2,56	1,93	2,26	2,07	0,13	2,43	0,15
1,8-Cineole	1,86	2,08	2,38	2,51	2,55	2,81	2,26	0,36	2,47	0,37	1,57	1,53	2,09	1,97	3,27	1,86	2,31	0,87	1,79	0,23
(Z)- β -Ocimene	5,00	5,84	4,30	4,97	3,46	4,04	4,25	0,77	4,95	0,90	5,02	5,96	4,35	5,14	3,57	3,36	4,31	0,73	4,82	1,33
(E)- β -Ocimene	0,98	1,13	0,78	0,93	1,27	1,56	1,01	0,25	1,21	0,32	1,07	1,40	0,92	0,89	1,43	1,79	1,14	0,26	1,36	0,45
γ -Terpinene	0,10	0,14	0,11	0,11	0,10	0,01	0,12	0,03	0,10	1,38
Terpinolene	1,59	1,63	3,37	3,36	2,48	1,26	2,50	1,22	1,59	1,73	3,17	3,31	2,38	1,12	2,52	1,12
Linalool	3,66	4,39	4,39	5,29	2,47	3,053	3,51	0,97	4,24	1,12	4,38	4,91	5,19	5,68	2,97	3,45	4,18	1,13	4,68	1,13
Camphor	0,37	0,38	0,67	0,79	0,87	1,00	0,64	0,25	0,72	0,31	0,36	0,46	0,66	0,73	0,85	0,89	0,62	0,25	0,69	0,22
Terpinen-4-ol	0,14	0,07	0,17	0,18	0,59	0,23	0,31	0,20	0,04	0,36	0,21
α -terpineol	0,20	0,20	0,12	0,21	0,16	0,05	0,21	0,00	0,29	0,14	0,41	0,26	0,32	0,19	0,34	0,07	0,20	0,06
Estragole	11,48	9,44	14,46	12,22	24,98	22,82	16,97	7,10	14,83	7,06	13,55	11,67	16,17	13,93	24,49	24,07	18,07	5,71	16,56	6,60
citronellol	0,30	0,29	0,60	0,78	0,89	0,811	0,41	0,54	0,64	0,24	0,71	0,15
Linalool acetate	0,30	0,72	0,22	0,49	0,18	0,26	0,24	0,06	0,49	0,23	0,21	0,29
Bornyl acetate	1,02	1,00	1,17	1,09	3,10	2,70	1,76	1,16	1,60	0,95	0,96	1,11	1,13	0,34	2,92	2,50	1,67	1,09	1,32	1,09
α -Terpinyl acetate	1,20	1,20	1,20	0,98	1,34	1,24	1,25	0,08	1,14	0,14	1,28	1,12	1,32	1,11	1,45	1,23	1,35	0,09	1,15	0,07
Citronellyl acetate	0,18	0,23	0,19	0,21	0,10	0,12	0,16	0,05	0,19	0,06	0,30	0,33	0,37	0,27	0,22	0,25	0,30	0,07	0,28	0,04
α -Copaene	2,42	2,11	1,36	1,24	1,02	0,94	1,60	0,73	1,43	0,61	2,22	1,96	1,35	1,16	1,00	0,92	1,52	0,63	1,35	0,54
β -Cubebene	0,35	0,40	0,18	0,24	0,20	0,25	0,24	0,09	0,30	0,09	0,30	0,36	0,19	0,22	0,19	0,45	0,23	0,06	0,35	0,12
β -Elemene	1,01	1,22	0,60	0,81	0,56	0,73	0,72	0,25	0,92	0,26	0,98	1,06	0,68	0,64	0,61	0,64	0,76	0,19	0,78	0,24
Methyl Eugenol	8,72	5,92	7,21	4,98	2,03	1,07	5,99	3,51	3,99	2,57	10,13	6,74	8,62	6,50	3,36	2,59	7,37	3,55	5,28	2,33
(E)- β -Caryophyllene	1,34	1,46	1,07	0,96	0,55	0,86	0,99	0,40	1,09	0,32	0,60	0,76	0,36	0,74	0,19	0,31	0,39	0,21	0,60	0,26

COMPUESTOS	DB-5MS										HP-INNOWAX									
	%CANTIDAD RELATIVA						MS		FID		%CANTIDAD RELATIVA						MASAS		FID	
	HRH1		HRH2		HRH3		\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	HRH1		HRH2		HRH3		\bar{X}	σ	\bar{X}	σ
	MS	FID	MS	FID	MS	FID					MS	FID	MS	FID	MS	FID				
α -Humulene	0,41	0,51	0,23	0,34	0,20	0,24	0,28	0,11	0,36	0,13	0,36	0,47	0,26	0,41	0,21	0,28	0,28	0,08	0,39	0,10
γ -Muuroolene	0,16	0,27	0,11	0,20	0,13	0,24	0,14	0,03	0,24	0,03	0,18	0,29	0,17	0,26	0,18	0,28	0,18	0,01	0,28	0,02
D-Germacrene	12,97	11,92	8,39	7,56	9,67	8,67	10,34	2,36	9,38	2,27	11,96	10,61	7,65	6,95	8,78	7,95	9,46	2,23	8,51	1,89
Bicyclogermacrene	0,77	0,09	0,59	0,78	0,71	0,87	0,69	0,09	0,58	0,42	0,61	0,68	0,53	0,66	0,61	0,47	0,58	0,05	0,60	0,12
α -amorphene	0,17	0,40	0,12	0,15	0,15	0,04	0,28	0,17
α - Muuroolene	0,18	0,28	0,11	0,20	0,15	0,19	0,15	0,04	0,23	0,05	0,17	0,22	0,12	0,56	0,15	0,31	0,15	0,02	0,36	0,18
Germacrene A	0,45	0,36	0,24	0,24	0,24	0,21	0,31	0,12	0,27	0,08
γ -cadidene	0,29	0,07	0,18	0,73	0,19	0,09	0,22	0,06	0,30	0,38
δ -Cadinene	1,69	1,79	1,04	0,59	0,99	0,84	1,24	0,39	1,07	0,63	2,06	1,74	1,41	0,91	1,30	1,10	1,59	0,41	1,25	0,43
B-Germacrene	0,15	0,19	0,15	0,25
spathulenol	0,10	0,23
β -Eudesmol	0,69	0,92	0,49	0,51	0,35	0,31	0,51	0,17	0,58	0,31	0,72	0,65	0,61	0,58	0,42	0,44	0,58	0,15	0,56	0,11
t-Muurolol	0,44	0,13	0,33	0,28	0,29	0,37	0,35	0,08	0,26	0,12	0,16	0,54	0,14	0,15	0,15	0,01	0,35	0,28
β -Phellandrene	1,22	1,41	1,14	1,33	0,18	0,05	1,37	0,05
Germacrene-D-4-OL	0,11	0,23
cis- α -Copaen-8-ol	0,41	0,34	0,34	0,34	0,31	0,32	0,36	0,05	0,34	0,01
α -Cadinol	0,34	0,56	0,33	0,40	0,28	0,38	0,32	0,03	0,45	0,10
	*Total identificado						99,67		98,95		**Total identificado						99,96		99,83	

Compuestos según el orden de elución en la columna DB-5ms. **HRH**=*Hedyosmum racemosum* hembra. **HRH1**=Aceites de la primera recolección. **HRH2**: Aceites de la segunda recolección. **HRH3**: Aceites de la tercera recolección. *=Sumatoria del % de cantidad relativa en la columna DB-5ms-MASAS y DB-5ms-FID. **=Sumatoria del % de cantidad relativa en la columna HP-INNOWAX-MASAS y HP-INNOWAX-FID. \bar{X} =Promedio. σ = desviación estándar.

Fuente: Investigación Experimental.

En el aceite esencial extraído de las partes aéreas de especímenes con flores femeninas de *H. racemosum* y analizado por CG-EM y CG-FID, se identificaron 47 compuestos, de los cuales 39 compuestos están presentes en ambas columnas; en la columna DB-5ms se identificaron 43 compuestos con un porcentaje de identificación de 99,67% y en la columna HP-INNOWAX se identificaron 43 compuestos que representan el 99,96%.

En las muestras analizadas se identificaron 8 compuestos mayoritarios (Figura 36) entre los cuales tenemos: α -Pinene (5,43%), α -Phellandrene (26,47%), Limonene (3,36%), (Z)- β -Ocimene (4,25%), Linalool (3,51%), Estragole (16,97%), Methyl Eugenol (5,99%), D-Germacrene (10,34%).

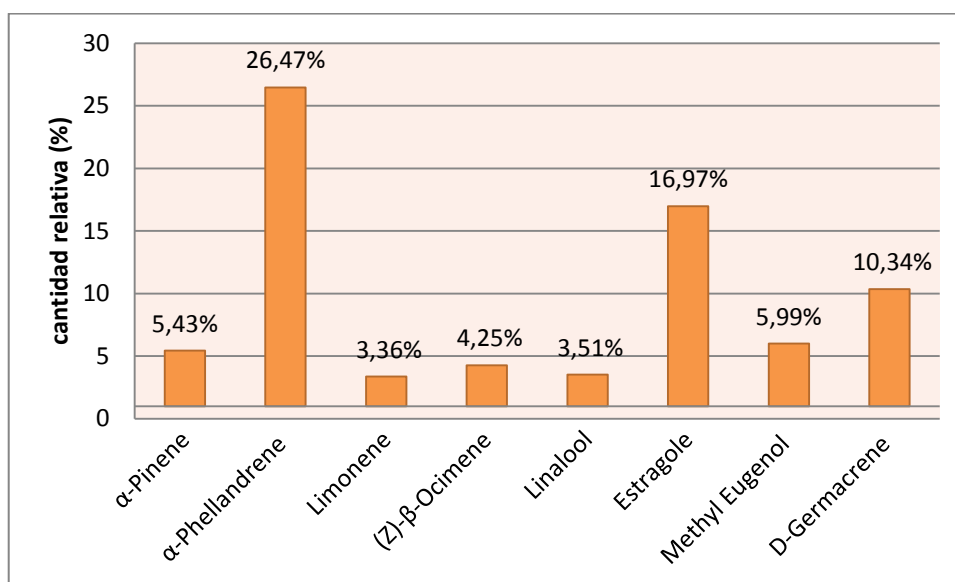


Figura 36. Compuestos mayoritarios del aceite esencial de *H. racemosum*.

Fuente: Investigación Experimental

No se han encontrado estudios referentes a la composición química del aceite esencial extraído a partir de las partes aéreas de especímenes hembra de *H. racemosum*. Sin embargo un sinnúmero de investigaciones tienen como objeto el estudio de la composición química del aceite esencial de varias especies del género.

Existe un estudio realizado con la especie *Hedyosmum racemosum*, se reportan como componentes principales Estragol (25,83%), α -Phellandrene (20,55%), Germacrene-D (10,26%), α -Pinene (7,40%), Linalool (6,16%), y Methyl Eugenol (4,90%), los mismos que son considerados como los constituyentes característicos de los aceites del género *Hedyosmum*; en nuestro estudio los compuestos mayoritarios son los mismos excepto por

el Limonene y (Z)- β -Ocimene que también fueron identificados, además existen diferencias en cuanto a los porcentajes de cantidad relativa de cada compuesto.

Las diferencias en cuanto a la composición y la abundancia relativa de los compuestos presentes en esta especie puede explicarse por el tipo de estructura reproductiva en una planta ya que las plantas dioicas femeninas alojan más energía y nutrientes para la reproducción que las plantas masculinas; por lo tanto, las plantas con flores femeninas tienen un limitado crecimiento, condición nutricional baja y son menos atacadas por insectos herbívoros que las plantas con flores masculinas (Lago et al., 2008). Además de lo expuesto anteriormente, pueden darse variaciones debido a las condiciones en que se desarrolló la planta; así como en las condiciones de extracción (método de extracción, tiempo, condiciones de la materia prima), produciendo cambios cualitativos y cuantitativos en el aceite (Sánchez, Pino, Correa, Naranjo, & Iglesia, 2009).

3.5. Actividad biológica del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*

Los métodos empleados para evaluar la actividad antimicrobiana permitieron medir la susceptibilidad in vitro de los microorganismos frente a agentes antimicrobianos determinando la potencia de la sustancia, la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas de una droga de origen vegetal y la concentración de la droga en el organismo humano.

3.5.1. Concentración mínima inhibitoria antibacteriana (CMI)

Mediante el método de microdilución en caldo realizado para evaluar la susceptibilidad de las bacterias se determinó que el aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* de la primera recolección presentó una inhibición significativa frente a *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 9997) con una CMI de 250 μg /mL (Tabla 12). Sin embargo el aceite no mostró actividad a las concentración 1000 μg /mL que fue la más alta que se probó.

Tabla 12. Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *H. racemosum* frente a siete cepas bacterianas.

Microorganismos	MIC (µg/mL) ^a		
	HRH1	HRH2	HRH3
* <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 9997)	250	>1000	>1000
* <i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC 27853)	>1000	>1000	>1000
* <i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 8427)	>1000	>1000	>1000
* <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	>1000	>1000	>1000
* <i>Salmonella typhimurium</i> (LT2)	>1000	>1000	>1000
** <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	>1000	>1000	>1000
** <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC25923)	>1000	>1000	>1000

^aConcentración mínima inhibitoria expresada en ug/mL; *Bacterias Gram-positivas **Bacterias Gram negativas; HRH: *Hedyosmum racemosum* hembra; HRH1: aceites de la primera recolección; HRH2: aceites de la segunda recolección; HRH3: aceites de la tercera recolección.

Fuente: Investigación Experimental

Existen varias investigaciones en donde se ha demostrado la susceptibilidad de las bacterias evaluadas ante el aceite esencial de especies del género *Hedyosmum* (V. Moreno, 2014; Ramirez, 2013). No obstante, solo ha reportado un informe en la literatura de la actividad biológica del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*, el cual no hace una distinción entre la actividad biológica del aceite obtenido de plantas macho y hembra (Ocampo, 2013).

Es complejo comparar los resultados obtenidos con los publicados en otros estudios, la divergencia de los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias de los aceites esenciales entre los diferentes estudios puede explicarse por la diversidad de las técnicas utilizadas, estado fenológico de la planta, la variación en la composición química de los aceites de acuerdo con los géneros y las especies de las plantas o también se le puede

atribuir a la estructura reproductiva de las mismas (Zapata, Durán, Stashenko, Betancur, & Mesa, 2010), muestra de ello es la interesante actividad antibacteriana que presenta el aceite esencial del estudio mencionado en el párrafo anterior, en el cual se obtiene el aceite tanto de plantas con flores masculinas como femeninas, en este estudio se reportó un C.M.I de 1000 y 500 $\mu\text{g/mL}$ frente a cepas de *E. faecalis* y *K. pneumoniae* respectivamente (Ocampo, 2013), con relación a nuestro estudio el aceite obtenido de plantas hembra no mostró inhibición del crecimiento bacteriano para *E. faecalis* sin embargo si presentó actividad antibacteriana frente a *k. pneumoniae* (250 $\mu\text{g/mL}$).

Al igual que en otros estudios, los aceites de las tres recolecciones generalmente presentan los mismos compuestos, no obstante existen diferencias en su composición y su cantidad relativa, muestra de ello es la presencia de algunos compuestos únicamente en la primera recolección, la misma que presenta actividad biológica, sugiriendo de tal forma la existencia de una relación entre la composición química del aceite y su actividad. Es difícil correlacionar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales con un compuesto específico debido a la complejidad y variabilidad de los aceites (Rojas et al., 2007).

Algunos autores sugieren que los componentes presentes en altas concentraciones no son necesariamente los responsables de gran parte de la actividad biológica, los componentes minoritarios pueden también contribuir a la actividad del aceite por efectos sinérgicos con otros componentes activos (Selim, 2011).

3.5.2. Concentración mínima inhibitoria antifúngica

En la tabla 13 se expone la concentración mínima inhibitoria de los aceites frente a los dermatofitos *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*.

Tabla 13. Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *H. racemosum* frente a dos cepas fúngicas.

Microorganismos	MIC ($\mu\text{g/mL}$) ^a		
	HRH1	HRH2	HRH3
* <i>Trichophyton rubrum</i> (ATCC 28188)	>1000	>1000	>1000
* <i>Trichophyton mentagrophytes</i> (ATCC	>1000	>1000	>1000

^a Concentración mínima inhibitoria expresada en $\mu\text{g/mL}$; *hongos esporulados HRH: *Hedyosmum racemosum* hembra; HRH1: aceites de la primera recolección; HRH2: aceites de la segunda recolección; HRH3: aceites de la tercera recolección.

Fuente: Investigación Experimental

Todos los aceites esenciales obtenidos del material de las diferentes recolecciones no presentaron actividad frente a ninguno de los hongos utilizados para este análisis, es decir todos los aceites no presentaron una CMI a 1000 $\mu\text{g/mL}$ que es la concentración más alta que se probó.

Probablemente el aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* a mayores concentraciones si inhiba el crecimiento fúngico lo cual no es relevante para nuestro estudio ya que se debe tener en cuenta el riesgo de presentar toxicidad a concentraciones mayores.

En estudios realizados con la misma especie se observó una actividad moderada (250 $\mu\text{g/ml}$) frente a *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* (Ocampo, 2013,) sin embargo hay que considerar que esta CMI es del aceite obtenido de plantas con flores masculinas y femeninas, sin hacer distinción del sexo. Además las condiciones de extracción del aceite esencial y la diferente composición química pueden ser responsables de las diferentes CMI.

3.6. Actividad Antioxidante

3.6.1. Método ABTS+

3.6.1.1. Lectura de las muestras de aceite esencial.

Para evaluar la capacidad antioxidante del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*, mediante el método de ABTS+, se utilizaron las absorbancias que se obtuvieron a partir de las muestras a diferentes concentraciones, estas se reemplazaron con la fórmula de la figura 34, descrita en el capítulo de metodología en la sección 3.6.4 para obtener el porcentaje de inhibición.

En la tabla 14, se reporta la absorbancia de las muestras a diferentes concentraciones, el porcentaje de inhibición de ABTS+ y el valor equivalente para ABTS+ de cada concentración.

Tabla 14. Datos de las muestras de *Hedyosmum racemosum* con el método de ABTS

DATOS DE LAS MUESTRAS DE ABTS+			
Concentración (ppm)	Absorbancia (nm)	% inhibición	Equivalente ABTS
100	0,005	99,55	836,92
50	0,001	99,90	839,83
25	0,003	99,65	837,75
12,5	0,004	99,60	837,33
5	0,017	98,29	826,50
0	0,709	26,48	231,08

Fuente: Investigación Experimental

Con lo mencionado anteriormente se elaboró un grafica en el programa Origin Pro 8.5. en la cual en el eje “x” se representa la concentración en ppm del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*, mientras que en el eje “y” se muestra el porcentaje de disminución determinado para cada concentración establecida para esta muestra, con esta gráfica se determinó la ecuación lineal para cada muestra, que a su vez nos permitirá calcular la concentración mínima necesaria al 50% o del aceite esencial.

En la figura 37 se puede observar la gráfica de CI₅₀ del aceite de *Hedyosmum racemosum*.

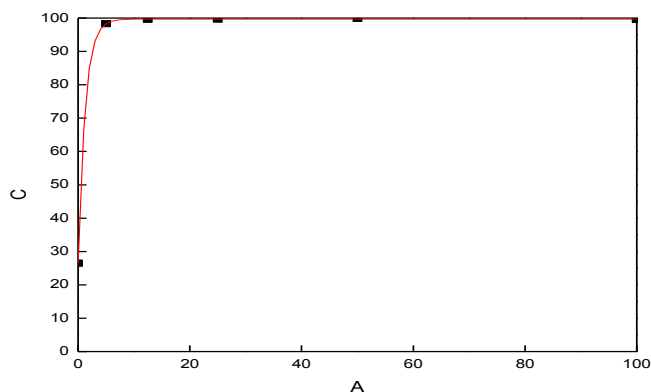


Figura 37. Gráfica de CI_{50} de la muestra de *Hedyosmum racemosum*.

Fuente: Investigación Experimental.

En la tabla 15 se muestra la ecuación utilizada para calcular la concentración media inhibitoria al 50% (CI_{50}).

Tabla 15. Ecuación necesaria para calcular CI_{50} en ABTS+.

CI_{50} de la muestra de <i>Hedyosmum racemosum</i>
$y = A_1 \times \exp\left(\frac{-x}{T_1}\right) + A_2$
<p>Dónde:</p> <p>Y = concentración igual a 50 X = valor de acción del aceite necesario para que la concentración de inhibición sea de 50%</p> <p style="text-align: center;">$A_1 = -73,19$ $T_1 = 1,25$ $Y_0 = 99,67$</p>
CI_{50} muestra = 0,01007 g/L

Fuente: Investigación Experimental

Para poder determinar el valor de “x” se utilizó programas computarizados de análisis estadístico que despejen la incógnita necesaria y arrojen el resultado.

Al evaluar la capacidad antioxidante del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*, a diferentes concentraciones frente al radical catiónico ABTS+, se obtuvo un valor de CI_{50} de 0,01007g/L.

3.6.1.2. Lectura del estándar de Trolox.

Las alícuotas que se tomaron de la solución de Trolox fueron tratadas de la misma manera que las muestras de aceite esencial, se midió la absorbancia de cada concentración y se determinó el porcentaje de inhibición de ABTS+ (Tabla 16), con la fórmula de la figura 32 descrita en la metodología.

Tabla 16. Datos para el estándar de trolox

DATOS PARA EL ESTÁNDAR DE TROLOX		
Concentración (ppm)	Absorbancia (nm)	% Inhibición
0	0,995	0
25	0,966	2,91
150	0,847	14,87
300	0,674	32,26
450	0,512	48,54
600	0,330	66,83
800	0,062	93,77

Fuente: Investigación Experimental

Con estos datos se obtuvo la gráfica del estándar Trolox . En la gráfica se extrapolo el punto 50 en el eje "y", obteniendo el valor de la concentración en el eje "x". El valor fue de 460 μ MOL/L para CI_{50} del estándar de Trolox. (Figura 38).

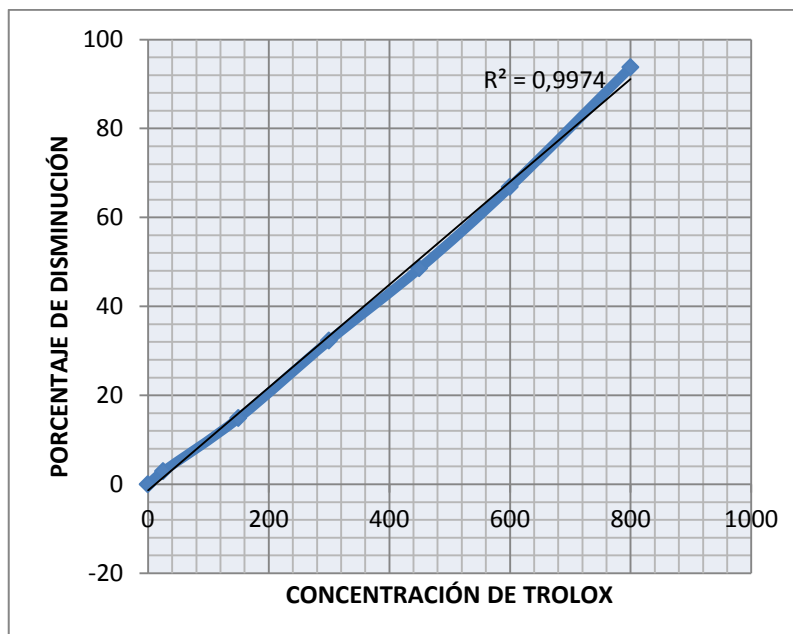


Figura 38. Gráfica del estándar de Trolox

Fuente: Investigación Experimental

3.6.1.3. Determinación de TEAC de ABTS+.

El ensayo TEAC, es la capacidad antioxidante equivalente al Trolox. Este valor de equivalente de Trolox es el valor referencial de la cantidad de Trolox que estaría presente por cada gramo de aceite esencial. El valor de TEAC se calculó mediante la fórmula que se muestra en la figura 33 en la sección 2.6.4. de la metodología.

En la tabla 17 se observa el valor de TEAC por el ensayo del radical ABTS+ del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*.

Tabla 17. Valores de los CI_{50} de la muestra y el trolox para determinar el TEAC para ABTS+

TEAC – ABTS+.	
CI_{50} muestra = 0,01007 g/L	CI_{50} Trolox = 460 μ MOL/L
TEAC ABTS+= 45,68 μ MOL/g	

Fuente: Investigación Experimental

Los resultados indican que el aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* presenta un valor de CI_{50} de 0,01007 g/L y un valor de TEAC equivalente 45,68 μ Moles de Trolox por cada gramo de aceite. Observándose que este aceite tiene una excelente actividad antioxidante ya que, mientras el valor de TEAC sea más alto, la capacidad antioxidante del aceite esencial va a ser mucho más favorable.

Existen estudios en donde se relaciona la presencia de algunos compuestos químicos con la capacidad antioxidante, tal es el caso del Terpinen-4-ol, que es un alcohol no saturado con un doble enlace que lo califica como un potencial secuestrante de radicales libres y al Germacreno-D que es altamente reactivo y capturador de radicales libres, compuestos que están presente en el aceite esencial de *H. racemosum* (Conde et al., 2012).

3.6.2. Método DPPH.

3.6.2.1. Lectura de las muestras de aceite esencial.

Además del método de ABTS+, también se evaluó la capacidad antioxidante de las muestras de aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*, mediante el método DPPH. El cual utiliza el radical libre DPPH, para reducir el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) en la 2,2-difenil-1-picril hidracina, esta reducción se produce por la acción antioxidante de los compuestos presentes en el aceite esencial que contengan grupos –OH que decoloren el reactivo DPPH (Conde et al., 2012).

Los datos obtenidos mediante el método de radical DPPH, fueron analizados de la misma manera que los datos obtenidos por el método ABTS+; las concentraciones del aceite esencial evaluadas en el espectrofotómetro arrojaron datos de absorbancia, con los cuales se determinó el porcentaje de disminución de DPPH para cada concentración establecida, para esto se utilizó la fórmula 34 que se encuentra en el capítulo de metodología.

En la tabla 18 se presentan los datos de las absorbancias y porcentajes de disminución.

Tabla 18. Datos de las muestras de *Hedyosmum racemosum* con el método de DPPH

DATOS DE LAS MUESTRAS DE DPPH		
Concentración (ppm)	Absorbancia (nm)	% inhibición
100	0,002	1,71
50	0,0055	4,70
25	0,023	19,66
12,5	0,05	42,74
5	0,081	69,23
0	0,117	100,00

Fuente: Investigación Experimental

Posteriormente a la obtención de estos datos, se utilizó el programa estadístico computarizado Origin Pro 8.5 para realizar la gráfica correspondiente al CI_{50} de la muestra y así obtener la ecuación de la gráfica necesaria para determinar el valor de la concentración media inhibitoria del 50%.

En la figura 39 se observa la gráfica de la muestra obtenida para este aceite.

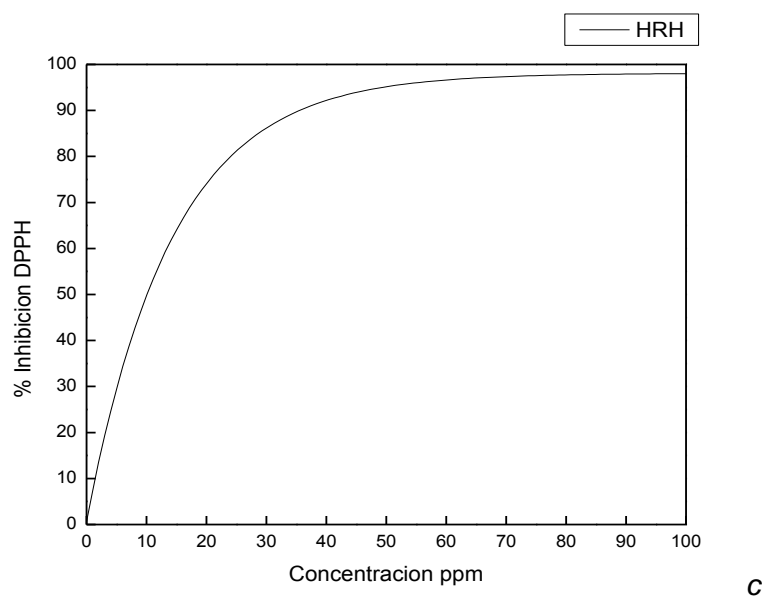


Figura 39. Gráfica de CI_{50} de la muestra de *Hedyosmum racemosum*.

Fuente: Investigación Experimental

A partir de la gráfica de la figura 39 se obtiene la ecuación necesaria para determinar CI_{50} de la muestra. En la tabla 19 se muestra la ecuación y los valores determinados para cada carácter.

Tabla 19. Ecuación necesaria para determinar CI_{50} en DPPH.

CI_{50} de la muestra de <i>Hedyosmum racemosum</i>
$y = A_1 \times \exp\left(\frac{-x}{T_1}\right) + Y_0$
<p><i>Dónde:</i></p> <p>Y = concentración igual a 50 X = valor de acción del aceite necesario para que la concentración de inhibición sea de 50%</p> <p style="text-align: center;">$A_1 = -97,40$ $T_1 = 14,28$ $Y_0 = 98.08$</p>
CI_{50} muestra = 0,01007 g/L

Fuente: Investigación Experimental

Al igual que en el método ABTS+, para determinar el valor de “x” se utilizó programas computarizados de análisis estadístico que despejen la incógnita necesaria y arrojen el resultado.

El valor de CI_{50} de la muestra por este método fue de 0,01007 g/L el mismo que es igual al obtenido por el método ABTS+.

3.6.2.2. Lectura del estándar de Trolox.

En este método como en ABTS+, el estándar utilizado fue el Trolox. Las alícuotas que se tomaron de la solución estándar de Trolox tuvieron el mismo tratamiento que las muestras de aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*, el análisis se realizó por triplicado. Se realizaron los cálculos para determinar el porcentaje de disminución.

En la tabla 20 se detallan los datos de absorbancia y porcentaje de disminución para Trolox

Tabla 20. Datos para el estándar de Trolox

DATOS PARA EL ESTÁNDAR DE TROLOX		
Concentración (ppm)	Absorbancia (nm)	% Inhibición
0	0,117	0
25	0,117	0
150	0,105	10,26
300	0,092	21,79
450	0,064	45,30
600	0,047	59,83
800	0,031	73,50

Fuente: Investigación Experimental

En la figura 40, se observa la gráfica del estándar del Trolox.

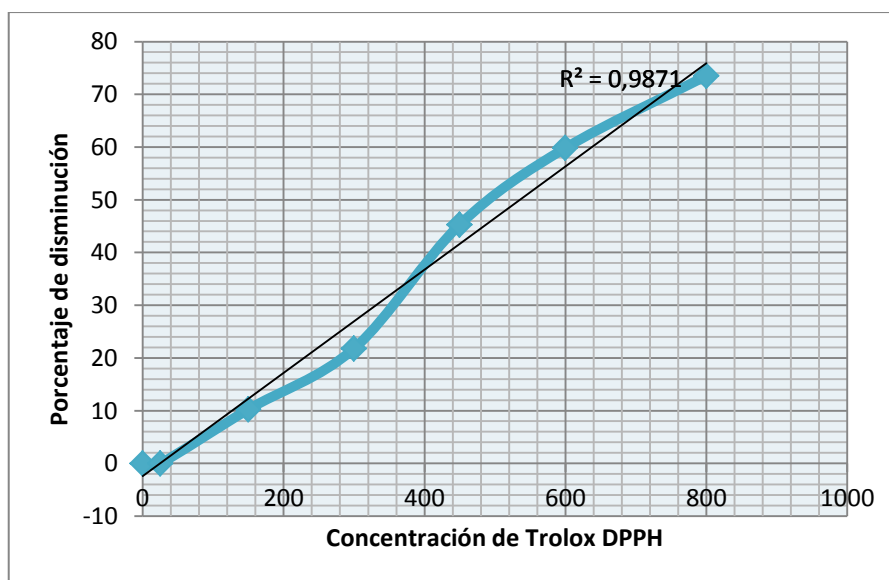


Figura 40. Curva de estándar de Trolox.

Fuente: Investigación Experimental

En la gráfica se extrapola el punto 50 del eje “y”, obteniendo el valor de la concentración en el eje “x”. Así determinamos el valor de CI_{50} del estándar de Trolox.

El valor obtenido de CI_{50} para el estándar de Trolox por este método, es de 480 $\mu\text{MOL/L}$ muy similar al valor obtenido de CI_{50} para el método ABTS+. Esta variación puede ser atribuida a las condiciones de trabajo.

3.6.2.3. Determinación de TEAC de DPPH.

El ensayo TEAC, es la misma fórmula aplicada en el método ABTS+. El valor de equivalente de Trolox es el valor referencial de la cantidad de Trolox por cada gramo de aceite esencial.

El valor de TEAC se calculó mediante la fórmula que se encuentra en la figura 33 de la sección 2.6.4. de la metodología.

En la tabla 21 se presenta el valor de TEAC obtenido por el método de DPPH para el aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*.

Tabla 21. Valores de los CI_{50} de la muestra y el trolox para determinar el TEAC para DPPH.

TEAC – DPPH	
CI_{50} muestra = 0,01007 g/L	CI_{50} Trolox = 480 $\mu\text{MOL/L}$
TEAC-DPPH= 47,66 $\mu\text{MOL/g}$	

Fuente: Investigación Experimental

Trolox posee una actividad antioxidante excelente, por eso es utilizado como referencia en los dos ensayos utilizados.

Mediante el ensayo de DPPH el valor de CI_{50} muestra fue de 0,01007 g/L y el valor de TEAC fue de 47,66 μMoles de Trolox por cada gramo de aceite. Al comparar los resultados de TEAC obtenidos con el método DPPH y con el método de ABTS+ (45,68 $\mu\text{MOL/g}$) se puede observar una leve variación, sin embargo se determinó que tiene una buena actividad antioxidante para ambos métodos.

CONCLUSIONES

- 1) El promedio de humedad de la materia vegetal fue de 58 %.
- 2) El rendimiento promedio más alto del material vegetal recolectado en estado fresco fue de 0,26% mientras el rendimiento más bajo obtenido fue de 0,20%.
- 3) La densidad obtenida en las recolecciones fue de 0,9056 g/cm³, 0,9074 g/cm³ y 0,8984g/cm³ para la primera, segunda y tercera recolección respectivamente. La media resultado de los valores anteriormente mencionados fue de 0,9038 g/cm³.
- 4) Para el índice de refracción el valor más alto fue de la tercera recolección con (1,4904), el más bajo fue de la segunda recolección (1,4870). El promedio final del índice de refracción de las muestras fue de 1,4883.
- 5) En la composición química del aceite esencial se identificaron 47 compuestos, de los cuales 39 compuestos están presentes en ambas columnas.
- 6) En la columna DB-5MS se identificaron 43 compuestos con un porcentaje de identificación de 99,67%
- 7) En la columna HP-INNOWAX se identificaron 43 compuestos que representan el 99,96%.
- 8) Los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* hembra fueron α -Pinene (5,43%), α -Phellandrene (26,47%), Limonene (3,36%), (Z)- β -Ocimene (4,25%), Linalool (3,51%), Estragole (16,97%), Methyl Eugenol (5,99%),y D-Germacrene (10,34%).
- 9) Los aceites obtenidos en la primera recolección presentaron inhibición significativa (CMI 250 μ g/mL) frente a *Klebsiella pneumoniae* evidenciándose la estrecha relación que existe entre composición química y actividad biológica.

- 10) El aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* fue inactivo frente a las hongos en estudio, es decir no mostraron actividad con ninguno de los microorganismos en las concentraciones máximas evaluadas.
- 11) El aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* presenta buena actividad antioxidante mediante el ensayo de ABTS con un valor de $CI_{50} = 0,01007 \text{ g/L}$ y un valor de TEAC de $45,68 \mu\text{MOL}$ de trolox/g aceite.
- 12) El aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* presenta buena actividad antioxidante mediante el ensayo de DPPH con un valor de $CI_{50} = 0,01007 \text{ g/L}$ y con un TEAC de $47,66 \mu\text{MOL}$ de trolox/g aceite.

RECOMENDACIONES

- 1) La selección de la materia prima es importante antes de la extracción, ya que el vapor puede arrastrar contaminantes y afectar el aceite.
- 2) Es recomendable tener en cuenta cómo funciona el equipo de destilación, antes de iniciar el proceso de extracción del aceite esencial con la finalidad de evitar resultados desfavorables.
- 3) Realizar pruebas para determinar cuáles son las mejores condiciones en las que se pueda destilar la materia vegetal, es decir tratar de establecer en qué estado fenológico hay un mayor rendimiento de aceite teniendo en cuenta el área de recolección.
- 4) Realizar estudios de los aceites esenciales de *Hedyosmum racemosum* a partir especímenes con flores masculinas para poder comparar si existen cambios tanto en su composición química como en su actividad biológica.
- 5) Se recomienda evaluar la actividad de los aceites frente a otras cepas bacterianas y fúngicas de interés en salud pública.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams., R. (2009). *Identification of Essential oil components by chromatography/MS Spectrometry* (4ta ed.).
- Albán, D., & Freire, D. (2009). *Obtención de bioetanol a partir de residuos de naranja (Citrus sinensis) provenientes del proceso agroindustrial en la provincia de Bolívar*. Ingeniero Agropecuario, Escuela Politécnica del Ejército, Ecuador.
- Angulo, A., Bravo, N., Falco, A., Pulido, A., Rivera, Z., & Cavallera, E. (2008). Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. *Revista de dermatología venezolana*, 46(4), 12-17.
- Arango, O., Pantoja, D., & Santacruz, L. (2012). Actividad antioxidante del aceite esencial del orégano (*Lippia origanoides* HBK) del Alto Patia. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(2).
- Arias, A. (2012). *Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de una especie Astaraceae (Chromolaneae laevigata) de la provincia de Loja* obtención del título de Bioquímico Farmacéutico, Universidad Técnica Particular de Loja.
- Bandoni, A. (2002). *Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. Su Aprovechamiento Industrial Para la Producción de Aromas y Sabores*. Buenos Aires, Argentina.
- Barrero., A. F., Pino., M. H. d., Burón., P. A., Moral, J. Q. d., & Arteaga., J. F. (2004). *Nuevas fuentes de antioxidantes*. Universidad de Granada, Granada- España.
- Benkeblia, N. (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT-Food Science and Technology*, 37(2), 263-268.
- Bercion, S., Baltaze, M. A., & Bourgeois, J. P. (2005). A new α -methylene γ -lactone sesquiterpene from *Hedyosmum arborescens*. *Fitoterapia* 76(7-8), 620–624.
- Berger, R. (2007). Bioprocessing and Sustainability. *Flavours and Fragrances. Chemistry*.
- Bodi, M., & Garmacho, J. (2007). Pseudomonoterapias aeruginosa: tratamiento combinado frente a m. *Medicina Intensiva*. 83-87.
- Brooks, G., Butel, J., & Morse, S. (2005). *Microbiología Médica*. Mexico.
- Bussmann, R., Malca-García, G., Glenn, A., Sharon, D., Chait, G., Díaz, D., & Benito, M. (2010). Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 132(1), 101–108. doi:doi:10.1016/j.jep.2010.07.048

- Bussmann, R., Sharon, D., A, F. P., P, D. D., Ford, T., Rasheed, T., & Silva, R. (2008). Antibacterial activity of northern-peruvian medicinal plants. *15(1)*, 127–148.
- Caoa, C., Penga, Y., Shib, Q., & Xiao, P. (2008). Chemical constituents and bioactivities of plants of Chloranthaceae. *Chemistry & Biodiversity*, *5*, 220-234.
- Castañeda, M., Muñoz, A., Martínez, J., & Stashenko, E. (2007). Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. [Scientia Et Technica,]. *Revista Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, *XIII(33)*, 165-166.
- Conde., C. G., Rueda., X. Y., & Patiño., G. S. (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Facultad de Ciencias Básicas*, 12-23
- Crespo, V. (2008). Generalidades sobre los hongos. Dermatomicosis: saprofitas y dermatofitosis Piel. 7.
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M. J., & Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador*. Herbario QCA & Herbario AAU.
- Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B., & Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International journal of food microbiology*, *74(1)*, 101-109.
- Espinal, P., Mantilla, J., Saavedra, C., Leal, L., Alpuche, C., & Valenzuela, E. (2004). Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasas de espectro extendido. *Biomédica*, *24(3)*(252-261).
- Espinosa, R. (1997). *Estudios botánicos en el sur del Ecuador:Loja:Herbario-Loja Reinaldo*. Universidad Nacional de Loja, Loja
- Faleiro, P. (2009). E.Coli enterohemorrágica.
- Fuertes, C., & Munguía, Y. (2001). Estudio comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb de tres regiones peruanas por cromatografía de gases y espectrometría de masas. . *Ciencia e Investigación*, *4*, 23-39.
- Ginatta, G. (2012). Biocomercio Andino: Base de datos de flora comercializada en el Ecuador. http://www.biocomercioecuador.ec/recursos/base-de-datos/flora/?pageNum_rsFlora=5&totalRows_rsFlora=299
- Gulavisí, L. (2008). Creación e introducción del manejo de la historia clínica, el parte diario y el concentrado mensual de Medicina Tradicional Andina, en un servicio de salud del ministerio de salud pública. *MSP*, *1*, 19-20.
- Gutiérrez, M., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. (Vol. 122).

- Hancock, L., & Perego, M. (2004). Systematic inactivation and phenotypic characterization of two-component signal transduction systems of *Enterococcus faecalis*. *Journal of bacteriology*.
- Kubitzki, K., Rohwer, J., & Bittrich, V. (1993). Flowering Plants. Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=yjlzrzbrXNQC>
- Lago, J. H. G., Romoff, P., Favero, O. A., Souza, F. O., Soares, M. G., Baraldi, P. T., & Correa, A. G. (2008). Chemical composition of male and female *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) essential oils. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36(9), 737-740.
- Lizcano, A., & Vergara, J. (2008). *Evaluación de actividad antimicrobiana de los extractos etanolicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatogenos*. Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C. .
- Lowy, F. D. (1998). Staphylococcus aureus infections. *New England Journal of Medicine*, 339(8), 520-532.
- Margulis, L., & Sagan, D. (2012). El proceso de nutrición en las plantas. 11(1).
- Martínez, A. (2003). *Aceites Esenciales*. Universidad de Antioquia, Colombia.
- Martinez, M., Molina, N., & Boucourt, E. (1997). Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. (guayaba). . *Rev Cubana Plant Med [online]*. , 2(1), 12-14.
- Meza, M., & Usbillaga, A. (2007). Composición del aceite esencial de *Origanum majorana* L. extraído por diferentes técnicas y su actividad biológica. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 24(4), 725-738.
- Michanics, S. (2003). *Escherichia coli* O157:H7, la bacteria que disparo el HACCP en la industria de la carne.
- Molares, S., González, S., Ladio, A., & Castro, M. (2009). Etnobotánica, anatomía y caracterización físico-química del aceite esencial de *Baccharis obovata* Hook. Et Arn. (Asteraceae: Astereae). *Acta Botánica Brasilica*. . 23(2), 578-589.
- Montoya, S., & Páez, C. (2012). *Documentación de la técnica de cromatografía de gases en el análisis de hidrocarburos alifáticos en aguas residuales*. Obtencion de titulo de Tecnólogo Químico, Universidad Tecnológica de Pereira.
- Moreno, s., Crescente, O., Ortiz, S., & Quintero, M. (2009). Composición química y actividad tóxica del aceite esencial de *Simsia pubescens* Triana. *Rev. Ciencia y Tecnología de América*, 745-747.

- Moreno, V. (2014). *Determinación fisicoquímica y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de H. purpurascens (Chlorataceae) de la provincia de Loja*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Neil, D. (2010). Adiciones a la flora del Ecuador. *Quito: Jatun Sacha*.
- 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 Chlorantaceae de la provincia de Zamora Chinchipe*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Olaya, J., & Méndez, J. (2003). Guía de plantas y productos medicinales.
- Olguín, P., & Rodríguez, M. (2004). Cromatografía de gases: Métodos en Biotecnología. Instituto de Biotecnología. Universidad Autónoma de México.
- Ortuño, M. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Aiyana ediciones* (Primera ed.). España.
- Palacio, G. (2000). Las plantas medicinales y aromáticas una alternativa para el futuro. *Boletín económico ICE N° 2652*, .
- Pérez, A., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal*, 195-211.
- Pérez, I. (2008). El uso de las plantas medicinales. *Intercultural*. 23-24.
- Pozo, X., & Naranjo, B. (2006). *Extracción, caracterización y determinación de la actividad antibacteriana y antimicótica del aceite esencial de Hierba Luisa (Cymbopogon Citratus (DC) stapf*. Ingeniero en Biotecnología., Escuela Politécnica del Ejército, Ecuador: s.n.
- Ramírez, E. (2013). *Determinación físico-química y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de H. strigosum (Chlorantaceae) de la provincia de Loja*., Universidad Técnica Particular de Loja.
- Rojas, J., Velasco, J., Rojas, L., Díaz, T., Carmona, J., & Morales, A. (2007). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Baccharis latifolia* Pers. and *B. prunifolia* H.B.&K. (Asteraceae). *Revista Natural Product Communications*, 2(12), 1245-1248.
- Romero, R. (2007). Microbiología y parasitología humana, Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. México: Médica Panamericana.
- Rueda, R. (2002). Miosis superficiales y dermatomicosis. *Colombia médica* 33, 10-16.
- Rueda, X., Parada, D., & Lugo, L. (2011). Variabilidad del rendimiento del aceite esencial de *Calycolpus moritzianus* nativo de Norte de Santander (Colombia) de acuerdo con el tratamiento de la hoja. *Bistua*. . 9(1), 48-54.

- Ruiz, V., & Moreno, S. (2005). Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Médica Panamericana.
- Ryman, D. (1995). Aromaterapia *Enciclopedia de las plantas aromáticas y de sus aceites esenciales. Los usos en belleza, cocina y salud* (Kairós S.A ed.). España.
- Rzedowski, G. (2006). Chloranthaceae. Flora del bajo y de regiones adyacentes. (pp. 1-7).
- Sánchez, Y., Pino, O., Correa, T., Naranjo, E., & Iglesia, A. (2009). Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (Caisimón de anís). *Protección Vegetal*, 24(1), 39-46.
- Sandoval, C., Moreno, C., & Abarca, K. (2011). Sepsis por *Pseudomonas aeruginosa* en un lactante previamente sano. *Revista chilena de infectología*, 28(6), 592-596.
- Sandoval, J. (1999). Evaluación del Rendimiento en la Extracción de Aceite Esencial de la hoja de Orégano (*Lippigraveolens*), variando el tamaño de muestra y aplicando los Métodos de Arrastre con vapor e Hidrodestilación a nivel Laboratorio. pag.19.
- Selim, S. (2011). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extract of the Egyptian lemongrass *Cymbopogon proximus* Stapf. *Revista Grasas y Aceites.*, 62(1), 55-61.
- Sutherland, D. (2014). *Evaluación de la actividad inhibitoria del crecimiento tumoral de los extractos metonólico y de acetato de etilo de Hedyosmum scabrum, H. racemosum y H. purpurascens, en las líneas celulares RKO, MCF-7, D384 Y PC3 mediante el ensayo MTS.*
- Vázquez, L., & Saltos, N. (2009). Ecuador su realidad. Quito: Artes Gráficas Silva.
- Zamora, N. (2006). Flora digital de la selva. Organización para Estudios Tropicales. 1, 1-3.
- Zapata, B., Durán, C., Stashenko, E., Betancur, L., & Mesa, A. (2010). Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27(2), 101-103.

ANEXO 1 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

PRINCIPIO:

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

MATERIAL:

- Lámpara
- Pinza
- Balanza
- Crisol
- Desecador

PROCEDIMIENTO:

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

CÁLCULO:

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

Dónde:

Hm: %de humedad

m: peso de la cápsula vacía (gr)

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

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

ANEXO 2

DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO

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

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

Dónde:

R: Rendimiento expresado en porcentaje.

V: Volumen del aceite esencial extraído en mL.

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

ANEXO 3

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 siguiente fórmula:

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

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 4

DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

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 ±0.2°C y debe mantenerse a ±0.2°C.

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

Resultados:

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

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

Dónde:

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

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 5

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÍNDICES DE KÓVAST

^d ref. 1; ^e ref. 2; ^f ref. 3; ^g ef. 4; ^h ref. 5; ⁱ ref. 6; ^j ref. 7; ^k ref. 8; ^l ref.9; ^m ref. 10; ⁿ ref. 11; ^ñ ref. 12; ^o ref. 13; ^p ref.

1. Adams, R.(2009) Identification of Essential oil componensts 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. Adams, R.P.; (2000) *Systematics of Juniperus section Juniperus based on leaf essential oils and random amplified polymorphic DNAs (RAPDs)*, *Biochem. Syst. Ecol.*, 28, 515-528
4. Demirci, B., Hüsnu Can Başer, K., Yıldız, B. and Bahçecioğlu, Z. (2003), Composition of the essential oils of six endemic *Salvia* spp. from Turkey . *Flavour Fragr. J.*, 18: 116–121. doi: 10.1002/ffj.1173
5. Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R. (2003). Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Rev. Acad. Colomb. Cienc*, 27(105), 579-597.
6. Tomi, F., Barzalona, M., Casanova, J., & Luro, F. (2008). Chemical variability of the leaf oil of 113 hybrids from *Citrus clementina* (Commun)× *Citrus deliciosa* (Willow Leaf). *Flavour and fragrance journal*, 23(3), 152-163.
7. Aidi Wannes, W., Mhamdi, B., & Marzouk, B. (2009). Variations in essential oil and fatty acid composition during *Myrtus communis* var. *Itálica* fruit maturation. *Food chemistry*, 112(3), 621-626.
8. Paolini, J., Muselli, A., Bernardini, A. F., Bighelli, A., Casanova, J., & Costa, J. (2007). Thymol derivatives from essential oil of *Doronicum corsicum* L. *Flavour and fragrance journal*, 22(6), 479-487.
9. Ruiz, S., Malagón, O., Zaragoza, 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.
10. Lassak, E. V., & Brophy, J. J. (2008). The Steam-Volatile Oil of Commercial "Almaciga" Resin (*Agathis philippinensis* Warb.) from the Philippines. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11(6), 634-637.
 11. Muñoz-Acevedo, A., Stashenko, E. E., Kouznetsov, V. V., & Martínez, J. R. (2011). Differentiation of leaf and flower extracts of basil (*Ocimum* sp.) varieties grown in Colombia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 14(4), 387-395.
 12. Başer, K., Demirci, B., Tabanca, N., Özek, T., & Gören, N. (2001). Composition of the essential oils of *Tanacetum armenum* (DC.) Schultz Bip., *T. balsamita* L., *T. chiliophyllum* (Fisch. & Mey.) Schultz Bip. var. *chiliophyllum* and *T. haradjani* (Rech. fil.) Grierson and the enantiomeric distribution of camphor and carvone†. *Flavour and fragrance journal*, 16(3), 195-200.
 13. Andreani, S., Barboni, T., Desjobert, J. M., Paolini, J., Costa, J., & Muselli, A. (2012). Essential oil composition and chemical variability of *Xanthium italicum* Moretti from Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, 27(3), 227-236.
 14. De Castro, O., Senatore, F., Rigano, D., Formisano, C., Cennamo, P., & Gianguzzi, L. (2008). Composition of the essential oil of *Petagnaea gussonei* (Sprengel) Rauschert, a relict species from Sicily (Southern Italy). *Flavour and fragrance journal*, 23(3), 172-177