



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

AREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE INGENIERO EN INDUSTRIAS AGROPECUARIAS

“Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica y antioxidante del aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii* Trel. de la provincia de Zamora Chinchipe”

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Rosales Acevedo, Verónica del Cisne

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

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: **“Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Sarcorrhachis sydowii* Trel. de la provincia de Zamora Chinchipe”** realizado por Verónica del Cisne Rosales Acevedo, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Julio de 2014

f) _____

DECLARACION DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Verónica del Cisne Rosales Acevedo 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 *Sarcorhachis sydownii* Trel. de la provincia de Zamora”**, 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: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f) _____

Autora: Rosales Acevedo Verónica del Cisne

Cédula: 1104374457

DEDICATORIA

A ustedes papá y mamá con todo mi Amor por ser las personas que han hecho todo lo posible para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuantas veces caía, y por ser mi ejemplo de vida.

A ti Javier por tu paciencia y comprensión, por sacrificar tu tiempo para que yo pudiera cumplir con el mío, gracias por estar a mi lado.

A ti mi princesa Daniela Isabella por regalarme tu dulce sonrisa y abrazos llenos de amor que me animaron cada día a no rendirme.

AGRADECIMIENTO

Agradecida contigo Señor Dios por protegerme durante todo mi camino y darme las fuerzas para superar los obstáculos y enfrentar los acontecimientos a lo largo de mi vida.

A mi madre Ruth Isabel por ser una mujer ejemplar para mí, una mujer luchadora que no se rinde ni se deja vencer ante cualquier situación de la vida, y a mi padre Fabián Patricio por su apoyo incondicional; a los dos por sus consejos sabios llenos de amor y ternura.

A mi familia por darme el ánimo y la energía para seguir con mis proyectos.

A mi director de tesis, Ing. Eduardo Valarezo por confiar en mí para el desarrollo de este proyecto y por brindarme sus conocimientos y experiencia para la realización de dicha tesis.

A mis compañeros del aula, que juntos aprendimos de las valiosas enseñanzas de nuestros profesores.

A todos mis amigos y amigas que colaboraron en el desarrollo de esta investigación y me incentivaron para seguir adelante.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARATULA	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN	ii
DECLARACION DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. MARCO TEÓRICO	5
1.1. Aceites esenciales	6
1.1.1. Extracción	6
1.1.2. Clasificación.....	6
1.1.3. Caracterización	7
1.1.4. Propiedades.....	8
1.1.5. Usos y Aplicaciones.....	9
1.2. Actividad Biológica.....	9
1.2.1. Bacterias	10
1.2.1.1. Bacterias Gram positivas.....	12
1.2.1.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	12
1.2.1.1.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	12
1.2.1.2. Bacterias Gram negativas.....	13
1.2.1.2.1. <i>Escherichia coli</i>	12
1.2.2. Hongos.....	13
1.2.2.1. <i>Trichophytum rubrum</i>	14
1.2.2.2. <i>Trichophytum mentagrophytes</i>	14
1.3. Actividad Antioxidante	14
1.4. Plantas medicinales.....	15
1.5. Flora Ecuatoriana	15
1.5.1. Flora aromática del Ecuador.....	16

1.6. Familia <i>Piperaceae</i>	17
1.6.1. El género <i>Piper</i>	18
1.2.2.1. <i>Sarcorhachis sydowii</i>	18
2. MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.1. Metodología.....	21
2.1.1. Recolección del material vegetal	22
2.1.2. Determinación de la humedad.....	22
2.1.3. Extracción del aceite esencial.....	22
2.1.3.1. Determinación del rendimiento.....	23
2.1.4. Determinación de las propiedades físicas	24
2.1.4.1. Densidad relativa.....	24
2.1.4.2. Índice de refracción.....	24
2.1.5. Determinación de la composición química del aceite esencial.....	25
2.1.5.1. Cromatografía de gases.....	25
2.1.5.1.1. Preparación de la muestra.....	25
2.1.5.1.2. Corrida cromatográfica en la columna DB-5MS acoplada a espectrometría de masas.....	25
2.1.5.1.3. Corrida cromatográfica en la columna HP-INNOWAX acoplada a espectrometría de masas.....	26
2.1.5.1.4. Corrida cromatográfica en la columna DB-5MS acoplada al detector de ionización en llama FID.....	26
2.1.5.1.5. Corrida cromatográfica en la columna HP-INNOWAX acoplada al detector de ionización en llama FID.....	27
2.1.5.1.6. Identificación de los compuestos químicos	28
2.1.5.1.7. Índices de Kovats.....	29
2.1.6. Determinación de la actividad biológica.....	30
2.1.6.1. Actividad antibacteriana.....	30
2.1.6.1.1. Método de microdilución en caldo.....	31
2.1.6.1.2. Preparación de la muestra.....	31
2.1.6.1.3. Preparación del cultivo Overnigth (Bacterias).....	31
2.1.6.1.3.1. Inoculación.....	31

2.1.6.1.4. Procedimiento.....	32
2.1.6.2. Actividad antifúngica.....	32
2.1.6.2.1. Método de microdilución en caldo.....	32
2.1.6.2.2. Preparación de la muestra.....	33
2.1.6.2.3. Preparación de la suspensión de Inóculos Fúngicos.....	33
2.1.6.2.4. Procedimiento.....	33
2.1.7. Determinación de la actividad antioxidante	33
2.1.7.1. Método ABTS.....	34
2.1.7.1.1. Solución ABTS.....	34
2.1.7.1.2. Lectura de muestras ABTS.....	34
2.1.7.1.3. Curva estándar Trólox para ABTS.....	35
2.1.7.2. Método DPPH.....	35
2.1.7.2.1. Solución DPPH.....	35
2.1.7.2.2. Lectura de muestras DPPH.....	35
2.1.7.2.3. Curva estándar Trólox para DPPH.....	35
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
3.1. Humedad	38
3.2. Rendimiento.....	38
3.3. Propiedades físicas	39
3.3.1. Densidad relativa	39
3.3.2. Índice de refracción.....	40
3.4. Composición Química del Aceite Esencial de <i>Sarcorhachis sydowii</i> Trel.	41
3.4.1. Análisis Cualitativo.....	42
3.4.2. Análisis Cuantitativo.....	48
3.5. Actividad Biológica.....	53
3.6. Actividad Antioxidante	54
3.6.1. Actividad antioxidante por el método DPPH.....	54
3.6.2. Actividad antioxidante por el método ABTS.....	57
4. CONCLUSIONES	60
5. RECOMENDACIONES.....	61

6. BIBLIOGRAFIA.....	62
ANEXOS.	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos registrados de la región Sur del Ecuador	17
Tabla 2. Características Taxonómicas <i>Sarcorhachis sydowii</i> Trel.	19
Tabla 3. Parámetros operacionales para la columna DB-5 MS acoplada a espectrometría de masas	25
Tabla.4.Parámetros operacionales para la columna HP-INNOWAX acoplada a espectrometría de masas	26
Tabla 5. Parámetros operacionales para CG-FID en la columna DB-5MS	27
Tabla 6. Parámetros operacionales para CG-FID en la columna HP-INNOWAX	27
Tabla 7. Condiciones de crecimiento de las bacterias	31
Tabla 8. Porcentaje de Humedad en <i>Sarcorhachis sydowii</i>	38
Tabla 9. Rendimiento del aceite esencial de <i>Sarcorhachis sydowii</i>	38
Tabla 10. Densidad relativa del aceite esencial de <i>Sarcorhachis sydowii</i>	40
Tabla 11. Índice de refracción del aceite esencial de <i>Sarcorhachis sydowii</i>	40
Tabla 12. Composición química del aceite esencial de <i>Sarcorhachis sydowii</i>	44
Tabla 13. Cantidad relativa de la composición química del aceite esencial de <i>Sarcorhachis sydowii</i> en DB-5 & HP-INNOWAX (MS) y DB-5 & HP-INNOWAX (FID).....	49
Tabla 14. Concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de los aceites esenciales de <i>Sarcorhachis sydowii</i>	53
Tabla 15. Concentración, absorbancias medias y porcentaje de disminución del aceite esencial de <i>Sarcorhachis sydowii</i>	54
Tabla 16. Concentración, absorbancias medias y porcentaje de disminución del aceite esencial de <i>Sarcorhachis sydowii</i>	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de las bacterias Gram Positivas y Gram Negativas	11
Figura 2. Tinción de Gram	11
Figura 3. Fotografía de campo	19
Figura 4. Muestra botánica	19
Figura 5. Diseño Experimental	21
Figura 6. Área de recolección de la especie <i>Sarcorhachis sydowii</i>	22
Figura 7. <i>Sarcorhachis sydowii</i>	22
Figura 8. Proceso de Destilación	23
Figura 9. Cromatograma del aceite esencial de <i>Sarcorhachis sydowii</i> en columna DB-5MS.	41
Figura.10.Cromatograma del aceite esencial de <i>Sarcorhachis sydowii</i> en columna HP- INNOWAX.....	42
Figura.11.Absorbancia del DPPH frente a las diferente concentraciones de AE de <i>Sarcorhachis sydowii</i>	55
Figura 12. Porcentaje de Disminución del DPPH frente a las diferentes concentraciones de AE de <i>Sarcorhachis sydowii</i>	56
Figura.13.Absorbancia del DPPH frente a las diferente concentraciones de AE de <i>Sarcorhachis sydowii</i>	57
Figura 14. Porcentaje de Disminución de ABTS frente a las diferentes concentraciones de AE de <i>Sarcorhachis sydowii</i>	58

RESUMEN

El aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii* fue obtenido por Hidrodestilación. La composición química del AE se determinó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas y al detector de ionización de llama. La actividad biológica fue evaluada por el método de microdilución en caldo y la actividad antioxidante mediante dos métodos espectrofotométricos: el ensayo de ABTS, y el método DPPH. También se determinaron las propiedades físicas del aceite. Se identificaron 61 compuestos que representan el 95,60% del aceite. Los componentes más representativos fueron (E)-caryophyllene (25,07%), α -humulene (10,48%), α -selinene (7,58%) y β -selinene (6,08%), y algunos monoterpenos tales como el α -phellandrene (5,37%), α -pinene (3,73%). La densidad del aceite esencial de *S. sydowii* fue de 0,906g/cm³ y el índice de refracción fue de 0,9066. El AE no reveló actividad antibacteriana, pero si actividad antifúngica con una CMI de 500 y 1000 μ g/mL frente a *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185). El aceite esencial de esta especie presenta un CI₅₀ de 0,02 μ g/mL con el método DPPH y 6,96 μ g/mL con el método ABTS respectivamente para la actividad antioxidante.

PALABRAS CLAVES: *Sarcorhachis sydowii* Trel., aceite esencial, composición química, actividad biológica, DPPH, ABTS.

ABSTRACT

The essential oil of *Sarcorhachis sydowii* was obtained by hydrodistillation. The chemical composition of the EO was determined by gas chromatography coupled with mass spectrometry and the flame ionization detector. The biological activity was evaluated by broth microdilution method and the antioxidant activity by two spectrophotometric methods: ABTS assay, and the DPPH method. Oil physical properties were also determined. 61 compounds representing 95.60% of the oil were identified. The most representative compounds were (E)-caryophyllene (25.07%), α -humulene (10.48%), α -selinene (7.58%) and β -selinene (6.08%), and some monoterpenes such as α -phellandrene (5.37%), α -pinene (3.73%). The density of the essential oil of *S. sydowii* was 0.906g/cm³ and the refractive index was 0.9066. The AE showed no antibacterial activity, while as for *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* MIC values of 500 and 1000 μ g/mL were obtained. The essential oil of this species has an antioxidant activity (IC₅₀) of 0.02 μ g/mL and 6.96 μ g/mL measured by DPPH and ABTS methods, respectively.

KEYWORDS: *Sarcorhachis sydowii* Trel., essential oil, chemical composition, biological activity, DPPH, ABTS.

INTRODUCCIÓN

El presente estudio consistió en la determinación de la composición química, propiedades físicas, evaluación de la actividad biológica y actividad antioxidante del aceite esencial de *Sarcorhachis sydownii* Trel. de la provincia de Zamora. Se desarrolla en 3 capítulos, el primer capítulo titulado: Marco Teórico 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 Zamora Chinchipe” que se desarrolla en la Sección de Ingeniería de Procesos de la Universidad Técnica Particular de Loja. Con este estudio se contribuye al desarrollo del conocimiento sobre los aceites esenciales, sus propiedades y usos para aplicaciones en las diferentes industrias tales como: Farmacéutica, Cosmética y Alimenticia; la información es también alimentada en el Catálogo de Plantas Aromáticas. Una vez conocida la composición química, propiedades físicas y 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 es desarrollar el estudio de aceites esenciales provenientes de especies vegetales, y determinar los componentes químicos y las propiedades físicas presentes en la especie en estudio así como también determinar la actividad biológica y los objetivos específicos, también considerados como componentes del proyecto: Extracción del aceite esencial de *Sarcorhachis sydownii* y cálculo del rendimiento real; determinar las propiedades físicas y composición química las cuales nos permitirán establecer condiciones de uso, así como también determinar los compuestos mayoritarios y su importancia a nivel industrial. La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para determinar la actividad biológica del aceite esencial de *Sarcorhachis sydownii* y el de contribuir al desarrollo de nuevos estudios sobre *Sarcorhachis sydownii* fueron desarrollados en su totalidad. Para lo cual se inició con la recolección del material vegetal, al 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 fue analizada por 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 $\mu\text{fc}/\text{mL}$ para bacterias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa*

(ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC9997), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2)] y bacterias Gram-positivas *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), y una concentración de 5×10^4 esporas/mL para hongos dermatofitos *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185) y la actividad antioxidante mediante dos métodos: el ensayo del ácido 2,2-azinobis-(3- etilbenzotioazolín-6-sulfónico) (ABTS+), el cual está basado en la captación de los antioxidantes por el radical catión ABTS+, generado en el medio de reacción, usando como patrón el ácido 6-hidroxi- 2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico (Trólox). Este radical catión ABTS+ posee una coloración verde-azulada con un promedio de absorción entre 415 nm y 820 nm. El segundo método se basa en la reducción del radical DPPH (2,2-difenil-1- picrilhidracilo) por los compuestos antioxidantes de la muestra del AE. El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra conteniendo sustancias antioxidantes. La decoloración del radical se determina a 515 nm y la cuantificación se realiza por lo general, empleando soluciones patrón de Trólox.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas naturales y homogéneas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas. Estos aceites esenciales son componentes constituidos de terpenos, sesquiterpenos, ácidos, ésteres, fenoles, lactonas; todos ellos fácilmente separables ya sean por métodos químicos o físicos, como la destilación, refrigeración, centrifugación, etc. Los aceites esenciales se destacan como productos con un rápido desarrollo y múltiples posibilidades de aplicación en la agricultura (Pino et al. 2011).

Se les llama aceites por su apariencia física y consistencia que es bastante parecida a los aceites grasos (González Villa 2004), pero son totalmente distintos por su composición química, aunque ambos sean extraídos de la naturaleza.

1.1.1. Extracción

El proceso de extracción de aceites esenciales se puede realizar mediante varias técnicas como: prensado, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, enfleurage y con fluidos supercríticos (Rodríguez Álvarez et al. 2012).

Los procesos de extracción de aceites tienen una amplia aplicación en la industria, sobre todo de perfumería, cosmética, alimentación y farmacia (Linares Palomino 2008). La selección de un método dependerá de las necesidades y facilidades con las que se cuente, siendo la técnica de destilación por arrastre con vapor de agua la más empleada, a nivel industrial se la utiliza debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada (Salazar Mora y Mayanquer Chuga 2009).

1.1.2. Clasificación

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en distintas partes de las plantas: en las raíces, tallos, hojas, flores y frutos (Mire 1962). Se clasifican basándose en criterios como consistencia, origen y naturaleza química de sus principales compuestos (Rodríguez Álvarez et al. 2012).

- *Por su consistencia:* Esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los bálsamos son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización. Las oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas

(caucho, chicle, oleorresina de paprika, de pimienta negra, de clavero, etc.).

- *Por su origen:* Naturales, Artificiales y Sintéticos. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes (mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín enriquecidas con linalool, o la esencia de anís enriquecida con anetol). Los aceites esenciales sintéticos son los producidos por la combinación de sus componentes, los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química.
- *Por la clase química de componentes principales:* Monoterpenoides (ricos en monoterpenos, p.ej. Hierbaluisa, albahaca, salvia, etc.), Sesquiterpenoides (ricos en sesquiterpenos p.ej. Copiaba, pino junıpero, etc.), Fenilpropanoides (ricos en fenilpropanos p.ej. Clavo de olor, canela, anís, etc.) (Salazar Mora y Mayanquer Chuga 2009).

1.1.3. Caracterización

La caracterización química del aceite esencial consiste en el estudio de su composición química que se puede realizar mediante cromatografía de gases, así en el cromatograma se obtendrá información acerca del número de compuestos existentes, porcentaje de cada uno y, según la zona del cromatograma, una cierta noción sobre el tipo de terpenoide del que se trata (Linares Palomino 2008).

1.1.3.1. Cromatografía de gases

La química de los aceites esenciales se ha revolucionado con el desarrollo de técnicas analíticas modernas, de las cuales una de las más importantes es la cromatografía de gases, como tal, o combinada con la espectrometría de masas (Linares Palomino 2008).

La cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes a ser separados son distribuidos entre dos fases, una fase estacionaria y otra que se mueve en una dirección definida. Los componentes son separados por sus diferentes tasas de migración (IUPAC). La cromatografía puede ser clasificada por su utilidad y en base al material que se utilice como eluyente para separar los solutos. De acuerdo a su utilidad la cromatografía se clasifica en: analítica, utilizada para determinar los químicos presentes en una mezcla y en que concentración; y preparativa, utilizada para purificar grandes

cantidades de químicos (Olguín Pérez y Rodríguez Magadán 2004).

La cromatografía de gases es una técnica analítica que debido a su sensibilidad de análisis puede ser utilizada para separar compuestos orgánicos basada en sus volatilidades. También provee información cualitativa y cuantitativa de los componentes presentes en una mezcla. Por otra parte, el hecho de que con esta técnica las mezclas sean separadas en fase gaseosa, establece los límites de su utilización, que están marcados fundamentalmente por la estabilidad térmica de los compuestos a separar. Por lo general, la utilización de la cromatografía de gases está restringida a la separación de compuestos con un peso molecular menor de 1000 a una temperatura máxima de trabajo de aproximadamente 400°C (Olguín Pérez y Rodríguez Magadán 2004).

La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas, permite una identificación rápida de un gran número de productos (Linares Palomino 2008), se presenta un pico de un cromatograma de gases, determinando su estructura, e identificándolo con mayor certeza.

La asociación de las dos técnicas, GC (Gas Chromatography) y MS (Mass Spectrometry) da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas.

1.1.4. Propiedades

1.1.4.1. Propiedades físicas

- Tienen apariencia viscosa
- El color va desde un amarillo claro hasta azul oscuro.
- Tienen diferentes olores (dulce, ácido, amaderado, fresco, etc.)
- Rotación óptica a 20°C ((+)135.34, (-)254.63°Z).
- Densidad relativa a 20°C, menor a 1 que es la densidad del agua.
- Poseen índice de refracción elevado (a 20 °C 147428 nD, etc.) y la mayoría desvían la luz polarizada.
- Líquidos solubles en alcoholes y solventes orgánicos.
- Casi inmiscibles en disolventes polares asociados (agua, amoniaco).

1.1.4.2. Propiedades químicas

- Generalmente son líquidos a temperatura ambiente.
- Son inflamables
- No son tóxicos aunque pueden provocar alergias en personas sensibles a determinados terpenoides (Cadby y Troy 2002).
- Sufren degradación química en presencia de la luz solar, del aire, del calor, de ácidos y álcalis fuertes, generando oligómeros de naturaleza indeterminada.
- Se oxidan fácilmente.

1.1.5. Usos y Aplicaciones

Las aplicaciones de los aceites esenciales y de las esencias son múltiples y variadas. De los más de tres mil aceites esenciales analizados, se ha encontrado que más de doscientos tienen un alto valor comercial y se utilizan ampliamente en diferentes ramas de la industria (Almeida Velasco y Suárez Cedillo 2014), (González Villa 2004).

- Por sus propiedades aromáticas en la industria de alimentos, en perfumería y en la industria de productos de limpieza (jabones, ambientadores, etc.).
- Por sus propiedades farmacológicas como ingredientes de algunos preparados farmacéuticos o son base de perfumes y productos cosméticos finos, desodorantes, lociones, jabones líquidos, pastas dentífricas, etc.

Se ha establecido que los componentes de muchas esencias interfieren en la respiración y el transporte de electrones de diversas bacterias de ahí su uso en la conservación de alimentos y en preparados cosméticos (Almeida Velasco y Suárez Cedillo 2014).

Recientemente, se ha incrementado la búsqueda de antioxidantes de origen natural para ser usados en alimentos, o como base de nuevos fármacos y así reemplazar los antioxidantes sintéticos debido a las restricciones de carcinogenicidad que éstos presentan (Muñoz Acevedo et al. 2007).

1.2. Actividad Biológica

Los aceites esenciales de plantas aromáticas y medicinales presentan bioactividades notables (propiedades antifúngicas, antibacteriales y antioxidantes), atrayendo la atención de químicos de productos naturales y de importantes sectores de la industria farmacéutica,

de perfumes, cosmética y de alimentos, entre otras por sus posibles y viables aplicaciones. El estudio de los AE se ha enfocado en la actividad biológica que pueden presentar frente a microorganismos patógenos para el ser humano, así como en aquellos presentes en los alimentos, bien por su implicación en toxiinfecciones alimentarias, o por su capacidad para alterar las propiedades organolépticas y de conservación de los alimentos. Diversos estudios determinan que los aceites procedentes de: clavo de olor, canela, mostaza, orégano, romero y tomillo son los que poseen actividad antimicrobiana más elevada (Muñoz Acevedo et al. 2007).

Sobre el poder antiséptico de los aceites esenciales de plantas pertenecientes especialmente a la familia Labiadas hay amplia información, todas contienen un compuesto o principio activo propio pero varios compuestos son comunes a numerosas especies. Algunos de los aceites esenciales poseen propiedades insecticidas y fungicidas y se utilizan en preparados especiales. Las plantas de uso tradicional ofrecen posibilidades para la búsqueda de principios bioactivos o Etnomedicina siendo una alternativa de uso de antisépticos estándar (Albado Plaus et al. 2001).

Algunos aceites son activos contra bacterias pero no contra hongos y viceversa, mientras que otros estimulan el crecimiento de estos microorganismos. Los aceites esenciales han demostrado capacidad inhibitoria frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, resultando estas últimas más resistentes. Los terpenos que forman parte de los AE son los que les confieren sus propiedades biológicas (Oliva 2011).

1.2.1. Bacterias

En la naturaleza existen dos clases de células, las procariontas y las eucariotas; las primeras son evolutivamente más antiguas, sólo se hallan como seres unicelulares y constituyen las bacterias.

Las bacterias poseen un tamaño medio que oscila entre 2 y 10 μm . Por su morfología, las bacterias se clasifican en cocos, cuando tienen forma redondeada, y bacilos, cuando muestran una morfología alargada (Prats 2006).

Las bacterias se clasifican en dos grupos diferentes en función de la estructura de su pared celular. En la figura 1 se observa la estructura de las bacterias Gram-positivas, que poseen una gruesa capa de péptidoglucano; y las bacterias Gram-negativas, que tienen adosada por fuera una delgada capa de péptidoglucano así como una membrana rica en lipopolisacáridos (Prats 2006).

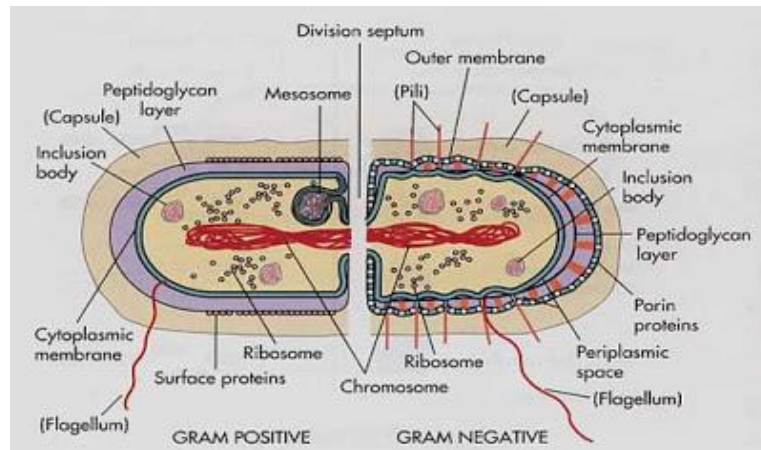


Figura 1. Estructura de las bacterias Gram Positivas y Gram Negativas
Fuente: (Asca et al. 2010)

El mecanismo de acción de la técnica de tinción de Gram, que se observa en la figura 2, se basa en diferencias de la estructura de la pared celular de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y en la forma en que reacciona frente a diversos reactivos (sustancias utilizadas para provocar una reacción química). El principal colorante que se emplea en esta técnica (violeta de genciana o cloruro de metilrosanilina) tiñe de color violeta tanto a las células Gram-positivas como las células Gram-negativas, porque ingresa en citoplasma de ambos tipos de células. En las Gram-negativas el colorante se queda atrapado en la capa gruesa de péptidoglucanos que rodea a la célula, mientras que en las Gram-negativas al tener una capa más delgada de péptidoglucano no retiene el violeta cristal y por esto las células se tiñen con safranina y las observamos rojas (Tortora et al. 2007).

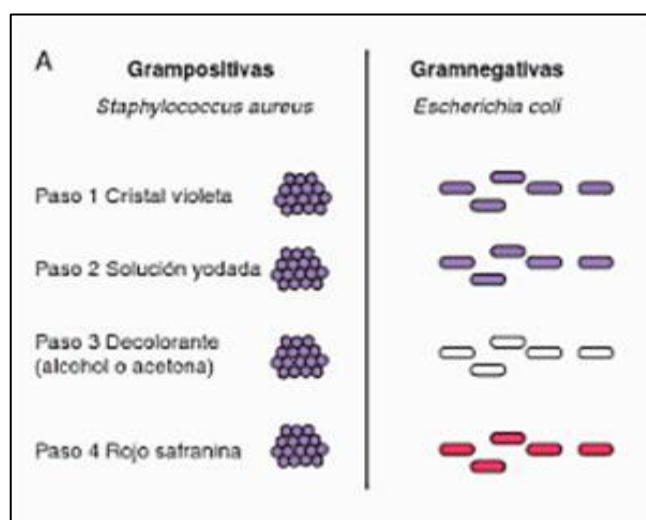


Figura 2. Tinción de Gram
Fuente: (Asca et al. 2010)

1.2.1.1. Bacterias Gram-Positivas

Las *bacterias Gram-positivas* poseen una pared celular interna y una pared de péptidoglucano (es un exoesqueleto que da consistencia y forma esencial para replicación y supervivencia de la bacteria), no tiene membrana externa ni espacio periplasmático, la red de mureína está muy desarrollada y llega a tener hasta 40 capas. La penicilina mata a estas bacterias Gram-positivas, ya que bloquea la formación de enlaces peptídicos entre las diferentes cadenas del péptidoglucano; son esporulantes, como *Streptococcus*, *Cisteria*, *Frankia*. Poseen otros componentes: ácidos teicoicos y lipoteicoicos y polisacáridos complejos (Asca et al. 2010).

1.2.1.1.1. *Staphylococcus aureus*

Es un coco Gram-positivo comúnmente asociado con el crecimiento de distintas colonias de excelencia cuando se siembran en medios selectivos. Es la única especie del género *Staphylococcus* que es coagulasa positivo, lo que permite que el microorganismo pueda convertir el fibrinógeno en fibrina en el suero humano que resulta en la formación de un coágulo. Esta capacidad, junto con su presencia ubicua en el medio ambiente (además de la presencia o de otros factores de virulencia) ha hecho de *S. aureus* un patógeno humano peligroso. *S. aureus* es parte de la flora normal de la piel y las superficies mucosas de muchos individuos, y las enfermedades resultantes de la infección con el microorganismo depende de las proteínas de superficie que permiten la adherencia a los tejidos del huésped junto con la producción y excreción de diversas proteínas extracelulares, lo que lleva a la destrucción del tejido y la proliferación del organismo (Dunkle et al. 2009).

1.2.1.1.2. *Enterococcus faecalis*

Los enterococos son cocos Gram-positivos que se agrupan en pares o cadenas cortas. Son anaerobios facultativos, capaces de desarrollarse en condiciones extremas, tales como, NaCl 6.5%, pH 9.6 y a temperaturas que oscilan entre 10-45°C. Pueden sobrevivir 30 min a 60°C y se desarrollan en presencia de 40% de sales biliares. La especie más frecuentemente aislada es *E. faecalis* en 80-90% de los aislamientos, seguido por *E. faecium*, el cual está aumentando su incidencia en hospitales, especialmente cepas multirresistentes. Se encuentran en el medio ambiente y su hábitat más importante es el tracto gastrointestinal del hombre y los animales (Rodríguez 2008).

1.2.1.2. Bacterias Gram-Negativas

Las bacterias Gram-negativas poseen una pared celular compleja (pared celular interna, pared de peptidoglucano y bicapa lipídica externa), la membrana externa forma un saco rígido alrededor de la bacteria, mantiene su estructura y es barrera impermeable a macromoléculas, ofrece protección en condiciones adversas.

La penicilina no mata a las Gram-negativas, a causa de la capa de liposacáridos situada en la parte externa de la pared celular. Pueden ser anaerobios o aerobios y poseen proteínas con concentraciones elevadas (Asca et al. 2010).

1.2.1.2.1. *Escherichia coli*

E. coli es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo de importancia médica, registra antecedentes epidemiológicos. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Rodríguez Angeles 2002).

1.2.2. Hongos

Son organismos eucariotes, lo cual significa que tienen núcleos bien definidos por membranas y que contienen un determinado número de cromosomas, lo cual los diferencia de las bacterias. Los hongos son heterótrofos, por lo tanto dependen de la obtención de compuestos orgánicos a través de sus actividades saprofiticas o parasíticas. La mayoría de los hongos están constituidos por estructuras tubulares llamadas hifas, las cuales en algunas especies se mantienen simples, formando lo que se conoce como micelio, y en otras se agregan para formar estructuras con cierto grado de complejidad, como lo son las llamadas setas u hongos superiores. Las levaduras son una excepción a esta característica, siendo unicelulares (Martínez y Ocampo 1988).

Los hongos tienen una influencia directa sobre el bienestar del hombre; algunos altamente benéficos, como en la producción de antibióticos. Otros hongos juegan un papel importante en la naturaleza como degradadores de materia orgánica; pero por otra parte, son la principal causa de enfermedades en los cultivos agrícolas, afectando severamente la economía del hombre (Martínez y Ocampo 1988).

1.2.2.1. *Trichophytum rubrum*

Es un hongo filamentoso con microconidios piriformes (de 3-5,5 x 2-3,5 μm), sésiles sobre las hifas formando racimos. Crece bien en la mayoría de los medios de cultivo comunes como el Agar Sabourad Dextrosa, y, suele formar dos tipos de colonias: unas rojizas en anverso y reverso y las otras blancas con el reverso de color rojizo (pigmento rojo frecuente) (Pontón et al. 2002).

Las dermatofitosis son las micosis más comunes, siendo el *Trichophytum rubrum* el agente causal hasta en el 80% de los casos (Hernández-Salazar et al. 2007).

Es el dermatofito más frecuente aislado a nivel mundial y afecta principalmente: piel glabra, uñas de las manos y de los pies, pues tiene la capacidad de invadir el tejido queratinizado. El fluconazol es utilizado con frecuencia para el tratamiento de las onicomicosis (Gross-Martínez et al. 2014).

1.2.2.2. *Trichophytum mentagrophytes*

Es un hongo que produce colonias planas en Sabouraud dextrosa agar, de color blanco o crema con una superficie pulverulenta o aterciopelada y pigmento en el reverso amarillento o café-rosado, que con frecuencia se hace rojo-café con el tiempo; se encuentran numerosos microconidios semiesféricos o piriformes, con algunas hifas en espiral y clamidoconidios esféricos que se hacen más abundantes en cultivos viejos. Hidroliza urea en 5 días y la perforación de pelos es positiva. Su significancia clínica se refiere a que es antropófilico, causando con frecuencia tiña de los pies crónica, particularmente de tipo vesicular, tiña del cuerpo (más frecuentemente de las ingles), y algunas veces invasión superficial de la uña (Fernández et al. 2002).

1.3. Actividad Antioxidante

Las plantas contienen una gran variedad de componentes químicos o moléculas bioactivas, que pueden neutralizar los radicales libres como es el caso de los aceites esenciales (Almeida Velasco y Suárez Cedillo 2014). Obtener antioxidantes de fuentes naturales, ha posicionado a los productos naturales como una fuente de compuestos con potencial antioxidante comparable con la de antioxidantes sintéticos (Mesa et al. 2011).

El efecto antioxidante de las plantas aromáticas se debe a la presencia de grupos hidroxilo en los compuestos fenólicos (Arcila Lozano et al. 2004).

Una especie aromática puede contener más de 150 componentes como parte de su aceite esencial, varios estudios demostraron la actividad antioxidante de aproximadamente, 100 compuestos puros de aceites esenciales, con una diferencia significativa de timol, carvacol y eugenol, así mismo en otro estudio se evidenció la actividad antioxidante de más de 20 compuestos puros, entre los que destaca el geraniol, terpinoleno y γ -terpineno (Carhuapoma Y. et al. 2014).

1.4. Plantas medicinales

Los más antiguos documentos escritos, con aproximadamente 6.000 años de antigüedad, incluyen descripciones de plantas utilizadas como medicinales en esa época; se creía que existían personas superdotadas para reconocer las plantas medicinales, las venenosas o ambas (Fonnegra G. y Jiménez R. 2007).

El uso de las plantas con fines terapéuticos en la medicina tradicional es un importante legado que han dejado generaciones anteriores. Poco a poco se fueron transmitiendo los conocimientos y consecuentemente surgieron las drogas medicinales y el desarrollo de la farmacognosia que se encarga del estudio de las plantas medicinales; ya sea por ensayo y error el hombre utilizó los elementos que la naturaleza le brindaba para curar sus enfermedades y las de sus animales, y así mismo para mejorar su estado de ánimo (Fonnegra G. y Jiménez R. 2007). Por esta razón en las últimas décadas ha ido tomando cada día mayor importancia su estudio y el desarrollo de técnicas analíticas que permitan la determinación e identificación de las sustancias o principios activos contenidos en especies vegetales (Lizcano y Vergara 2008).

Aunque los avances tecnológicos han ido desplazando cada vez más el uso de los productos naturales, por sustancias artificiales, hoy por hoy, los consumidores prefieren los compuestos naturales, debido a sus características; de esta manera, se observa cómo crece su consumo y utilización, lo que ha dado paso a un desarrollo importante de la agroindustria de plantas aromáticas y medicinales a nivel mundial (Castañeda et al. 2007).

1.5. Flora Ecuatoriana

El Ecuador es considerado por muchos botánicos y ecólogos como uno de los países más ricos en biodiversidad a nivel mundial. A pesar de estar situado en plena zona ecuatorial, nuestro país no es completamente tropical o tórrido sino que presenta la más amplia variedad de climas según la localización ortográfica o topográfica (Patzelt 1996).

Es difícil establecer una correlación entre la altitud y la temperatura, pero se puede hacer una división ecológica altitudinal tomando en cuenta otros factores, especialmente la distribución de la flora ya que esta responde a las condiciones de temperatura y suelo. Existen alrededor de veintidós mil especies vegetales diferentes (Patzelt 1996).

Se registran alrededor de 16087 especies de las cuales 4173 son especies endémicas del Ecuador (Jorgensen y León-Yáñez 1999).

1.5.1. Flora aromática del Ecuador

En el Ecuador existen alrededor de 500 especies pertenecientes a 288 familias que son comúnmente usadas con fines medicinales, de estas 125 son las más comercializadas; pero para la mayoría no existe información científica básica, que permita conocer las mejores condiciones de obtención o producción de materia prima suficiente para suplir la demanda existente (Gallardo Montenegro 2011).

El Ecuador está considerado dentro de los países más megadiversos pues del total el 75% de las especies son plantas nativas y el 5% de ellas son endémicas, mientras que el 11% han sido introducidas (Valarezo Valdez y Meneses Chamba 2014); muchas especies fueron introducidas por los españoles, como la manzanilla (*Matricaria chamomilla*), otras como la sábila (*Aloe Vera*), han sido introducidas, naturalizadas y cultivadas, y otras como la Sangre de drago (*Croton lechlerii*) y la Uña de gato (*Uncaria tomentosa*) son nativas y se extraen de manera silvestre (Gallardo Montenegro 2011).

El Ecuador cuenta con tres regiones diferentes tanto geográfica como climáticamente, la cantidad de plantas medicinales también es diferente, siendo la región Oriente la que tiene un mayor número de especies (26%), seguida de la región Sierra (18%) y por la región Costa (14%). Dentro de la región Sur se encuentra ubicada la provincia de Zamora Chinchipe que posee una gran variedad de plantas aromáticas, y muchas de ellas pertenecen a la familia Asteraceae, que es una de las familias que presenta un mayor número de especies usadas en el país con fines medicinales (Valarezo Valdez y Meneses Chamba 2014). El estudio realizado por Aguirre M. (2012) sobre la Dendrología del Sur del Ecuador, registra los datos que se indican en la tabla 1

Tabla 1. Datos registrados de la región Sur del Ecuador

Provincia	Especie	% de las especies en Ecuador	Endémicas
El Oro	1294	8,1	228
Loja	3039	19,1	639
Zamora-Chinchiipe	2715	17,7	568
Total región	7048	44,32	1207

Fuente: (Aguirre Mendoza 2012)

1.6. Familia *Piperaceae*

Esta familia está conformada por 10 a 12 géneros y aproximadamente 3000 especies a nivel mundial. Entre ellos están el género *Piper*, *Peperomia*, *Pothomorphe*, *Ottonia*, *Sarcorrhachis* y *Trianaeopiper* (López et al. 2010).

Estudios realizados en especies de la familia *Piperaceae* han revelado una gran variedad de efectos biológicos, lo que la convierte en una de las más promisorias para la búsqueda de compuestos bioactivos. El género más representativo es el género *Piper*, del cual se puede obtener aceites esenciales que presentan gran diversidad de compuestos (Celis et al. 2008).

Las especies de la familia *Piperaceae* comprenden hierbas, arbustos, árboles pequeños, lianas, muchas especies son epífitas. La familia apenas se extiende más allá de los trópicos y generalmente viven en áreas húmedas. Son utilizadas como especias: pimienta negra y blanca (frutos de *Piper nigrum*) como ornamental (*Peperomia*). También las utilizan para la fabricación de la bebida Kava (*Piper methysticum*) y en medicina popular (*Piper*) (Tovar del Río 2013).

Las *Piperaceae* se han utilizado tradicionalmente como fuente de insecticidas, condimentos y fitomedicamentos. El uso de estas especies en la protección de cultivos data del antiguo Egipto en donde se usaba el fruto seco de *Piper nigrum* como repelente en cultivos de cereales; muchos años después, estudios fitoquímicos y de actividad biológica realizados sobre esta y otras especies del género *Piper* demostraron la existencia de diferentes tipos de metabolitos secundarios con actividades insecticidas comprobadas principalmente sobre insectos de los órdenes Coleóptera, Himenóptera y Lepidóptera (Murillo et al. 2014).

La familia *Piperaceae* en su recolección de campo, se puede reconocer por tres rasgos principales: tallos articulados (nódulos), hojas asimétricas o cordadas, y los picos axilares (Wiat 2006).

1.6.1. El género *Piper*

El género *Piper*, perteneciente a la familia *Piperaceae*, ha sido objeto de estudios fitoquímicos y biológicos, motivados por sus numerosas aplicaciones etnobotánicas. Los aceites esenciales, obtenidos de diferentes plantas pertenecientes a este género, inhiben el crecimiento de un amplio grupo de microorganismos que causan infecciones importantes al hombre, las plantas y los animales (Sánchez et al. 2009).

Se considera que actualmente este género tiene cerca de 1500 especies y su mayor diversidad se encuentra en los bosques húmedos de las regiones tropicales de todo el planeta. En este género *Piper*, químicamente se han encontrado lignanos y neolignanos; taninos, saponinas, compuestos fenólicos, terpenos, flavonoides, flavononas, isoquinolinas, xantonas, limonoides y alcaloides entre otros. Muchos de estos compuestos, en especial fenoles y flavonoides son responsables de la actividad antioxidante (Mesa et al. 2011).

1.6.1.1. *Sarcorhachis sydowii*

Sarcorhachis es un género ampliamente reconocido de tal vez cinco especies que van desde el sur de Nicaragua hasta el norte de Perú y Brasil, con algunas especies descritas de las Antillas Menores (Arias et al. 2006).

Sarcorhachis sydowii es una liana con entrenudos superiores 8cm y con axilar inflorescencias (frente a hojas opuestas), flores bisexuales y frutas incrustadas y coalescente en el raquis algo carnosas en la madurez, muchas de las cuales son especies clave en su hábitat natural (Wanke et al. 2007).

Los estudios previos que se han encontrado sobre *Sarcorhachis* se refieren a la similitud se sus características taxonómicas con el género *Manekia* Trelease, según lo reportado por Bornstein (1996), quien reconoció que la única especie de *Manekia*, *M. urbani* Trelease, comparte varias características claves con *Sarcorhachis*, que en conjunto ayudan a distinguir *Manekia* de los taxones que quedan de *Piperaceae*. Estas características incluyen un hábito trepador, hojas alternas con base axilar, y frutas lateralmente incrustadas o en coalescente con raquis carnosas. (Arias et al. 2006).

Sarcorhachis sydowii Trel. es una liana con axilar inflorescencias perteneciente a la familia *Piperaceae*; en la Figura 3 y 4 se puede observar en estado natural y en estado seco respectivamente, el cual sirvió como boucher para su posterior identificación.



Figura 3. Fotografía de campo
Fuente: Rosales, Verónica

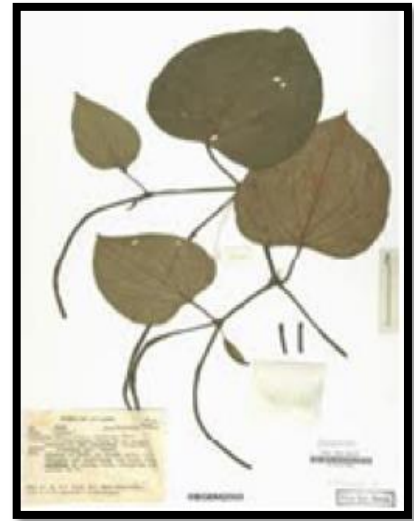


Figura 4. Muestra botánica
Fuente: Rosales, Verónica

A continuación en la tabla 2 se indica la clasificación taxonómica de *Sarcorhachis sydowii* Trel.

Tabla 2. Características Taxonómicas *Sarcorhachis sydowii* Trel.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Piperales
Familia	Piperaceae
Género	Sarcorhachis
Especie	<i>S. Sydowii</i>
Estatus	Nativa
Habitat	Arbusto, liana trepadora

Fuente: Cerón et. al 1994

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Metodología

La metodología que se llevó a cabo en esta investigación está expuesta en la figura 5.



Figura 5. Diseño Experimental

Elaboración: Rosales, Verónica

2.1.1. Recolección del material vegetal

El material vegetal se recolectó en la provincia de Zamora en el sector Numbami. Las coordenadas del área de recolección son: 728041E, 9540124N a una altura de 1161 m s.n.m. En la figura 6 se muestra el sitio de recolección.

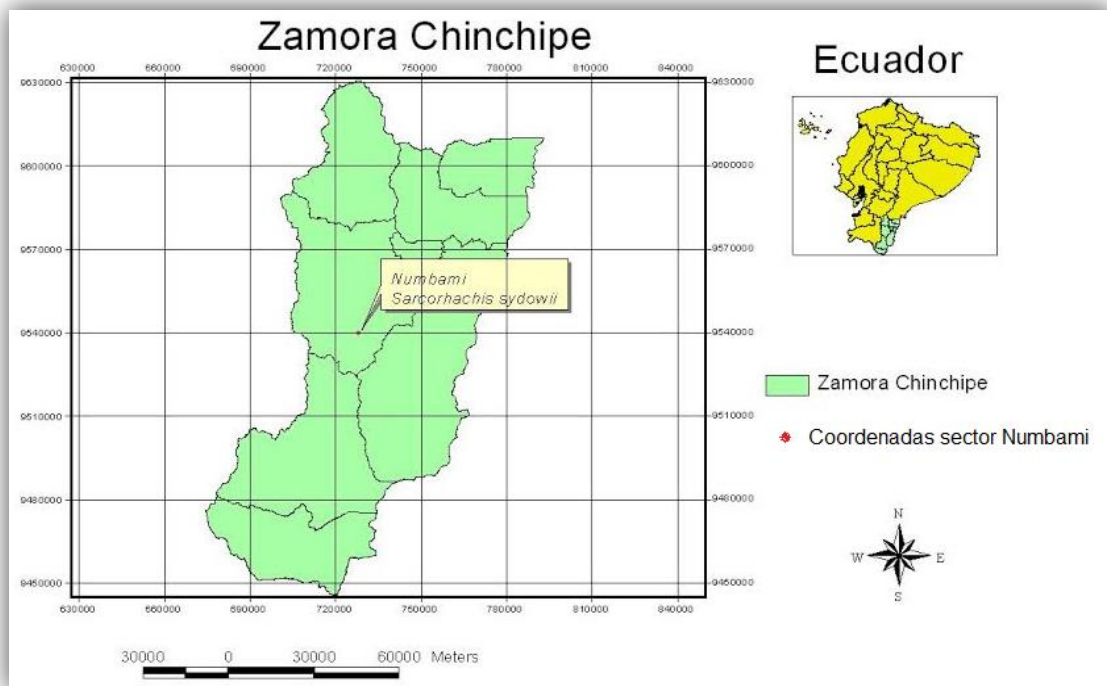


Figura 6. Área de recolección de la especie *Sarcorrhachis sydowii*

Elaboración: PhD. Vladimir Morocho UTPL

El material vegetal fue recolectado en estado de floración dentro de su hábitat natural (Figura 7). Se realizaron tres recolecciones cada 15 días y para la obtención del aceite esencial se utilizaron las partes aéreas de la planta.

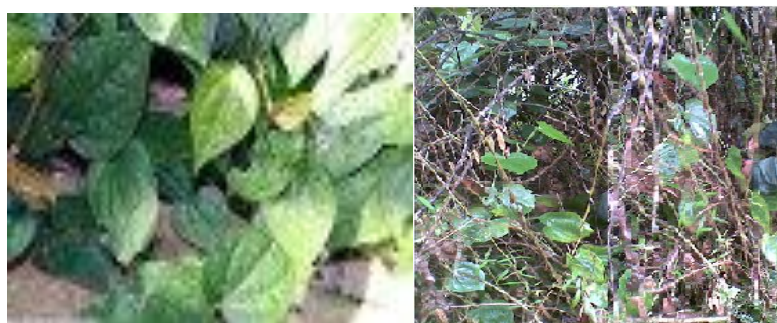


Figura 7. *Sarcorrhachis sydowii*

Fuente: Rosales, Verónica

2.1.2. Determinación de la humedad

Se emplearon las hojas de *Sarcorrhachis sydowii* en estado fresco, y se tomó 1g de muestra aproximadamente; una vez finalizado todo el procedimiento se realizó los cálculos respectivos para determinar la Humedad de la planta, por el método gravimétrico (ver Anexo I).

2.1.3. Extracción del aceite esencial

Para empezar el proceso de la extracción del aceite esencial de *Sarcorrhachis sydowii* se realizó un tratamiento post-cosecha, dicho tratamiento consistió en el corte de la materia vegetal para conseguir una mayor superficie de contacto al momento de la destilación, es decir para permitir que el vapor de agua pueda ingresar por todos los espacios existentes entre la materia. Una vez realizado dicho tratamiento la extracción del aceite esencial se efectuó por destilación con arrastre de vapor de agua (Figura 8), dicho proceso consiste en separar sustancias orgánicas insolubles en agua y ligeramente volátiles, de otras no volátiles que se encuentren en la mezcla, como resinas o sales inorgánicas u otros compuestos no arrastrables.



Figura 8. Proceso de Destilación

Fuente: Laboratorio de Ingeniería de Procesos

Elaboración: Rosales, Verónica

2.1.3.1. Determinación del rendimiento

Una vez terminada la destilación, con la ayuda de una probeta se midió el volumen (mL) del aceite esencial obtenido, y se trasvasó en frascos de 10mL color ámbar, para evitar efectos

de la luz en los compuestos del aceite, y, luego de cerrarlos herméticamente se almacenaron en refrigeración a 4°C para su conservación y posteriores análisis. Para determinar su rendimiento se utilizó la fórmula detallada en el Anexo II.

2.1.4. Determinación de las propiedades físicas

Las propiedades físicas que se determinaron para cada muestra obtenida de aceite esencial de *Sarcorrhachis sydowii* fueron la densidad relativa y el índice de refracción.

2.1.4.1. Densidad relativa

La densidad del aceite es la relación entre su peso y su volumen, y se ve afectada por la temperatura, por lo cual es preferible trabajar a una temperatura entre 20°C y 25°C (Páez Perilla 2013)

La densidad relativa se determinó según la norma ANFOR NFT75-111 (ISO 279:1998) (ver Anexo III), en la cual se realizaron tres repeticiones, obteniendo una densidad promedio de cada una de las muestras. Los materiales a utilizar son un picnómetro de 1mL, una balanza analítica y un termómetro.

2.1.4.2. Índice de refracción

El índice de refracción es un parámetro propio de cada aceite esencial, por lo que si un aceite es mezclado con otras sustancias, su índice de refracción cambia, por lo cual este es un parámetro que sirve para determinar su pureza. Su cálculo está basado en la ley de Snell. Esta es una expresión matemática que relaciona el ángulo de incidencia de un rayo de luz sobre una superficie líquida, con un ángulo de refracción (Páez Perilla 2013).

El índice de refracción se determinó mediante la norma AFNOR NF 75-112 (ISO 280:1998) (ver Anexo 4). Se utilizó un refractómetro ABBE, en el cual se puso dos gotas de aceite esencial sobre el diafragma del refractómetro, luego se calibró y se verificó el índice de refracción dado para cada muestra.

2.1.5. Determinación de la composición química del aceite esencial

2.1.5.1. Cromatografía de gases

Para identificar los componentes químicos del aceite esencial de la especie *Sarcorrhachis sydowii* se utilizó la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas CG–EM y al Detector de Ionización de Llama CG–FID, obteniendo resultados cualitativos y cuantitativos, se realizó en dos columnas capilares DB-5MS (5%-Fenil)-metilpolisiloxano) y HP-INNOWAX (Polietilen Glicol).

2.1.5.1.1. Preparación de la muestra

Las muestras de análisis se prepararon en un vial de cromatografía debidamente codificado, en el cual se colocó 990 μL de diclorometano, y 10 μL del aceite esencial de *Sarcorrhachis sydowii*, obteniéndose una concentración del 1% de aceite esencial.

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

La corrida cromatográfica se realizó con una mezcla de hidrocarburos de C_{10} (decano) a C_{25} (pentacosano), conocidos en el mercado como TPH-6RPM de CHEM SERVICE. Las condiciones de trabajo se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros operacionales para la columna DB-5 MS acoplada a espectrometría de masas

	Parámetro	Valor
Inyector	Modo	Split
	Radio de Partición	50:1
	Temperatura inicial	250°C
	Tipo de gas	Helio
	Volumen	1 μL
Horno	Temperatura inicial	50 °C
	Tiempo inicial	3 min
	Rampa	3 °C/min
	Temperatura final	230 °C
	Tiempo final	3 min
Columna	Capilar DB-5MS	
	Temperatura máxima	270°C
	Modo	Flujo constante
	Flujo inicial	0.9 mL/min
	Presión inicial nominal	6.50 psi
	Velocidad promedio	35 cm/seg

	Presión de salida	Vacío
Detector	Espectrómetro de masas	
	Temperatura	250°C
	Tipo de gas	Helio

Fuente: Agilent Technologies

Elaboración: Rosales, Verónica

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

La corrida cromatográfica se realizó bajo los parámetros operacionales que se indican en la Tabla 4., las muestras de aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii* se inyectaron usando la columna polar HP-INNOWAX.

Tabla 4. Parámetros operacionales para la columna HP-INNOWAX acoplada a espectrometría de masas

	Parámetro	Valor
Inyector	Modo	Split
	Radio de Partición	50:1
	Temperatura inicial	250°C
	Tipo de gas	Helio
	Volumen	1 µL
Horno	Temperatura inicial	50 °C
	Tiempo inicial	3 min
	Rampa	3 °C/min
	Temperatura final	230 °C
	Tiempo final	3 min
Columna	Capilar HP-INNOWAX	
	Temperatura máxima	270°C
	Modo	Flujo constante
	Flujo inicial	0.9 mL/min
	Presión inicial nominal	6.50 psi
	Velocidad promedio	35 cm/seg
	Presión de salida	Vacío
Detector	Espectrómetro de masas	
	Temperatura	250°C
	Tipo de gas	Helio

Fuente: Agilent Technologies

Elaboración: Rosales, Verónica

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

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

Se inyectaron las muestras de aceite esencial de *Sarcorhchis sydowii* y los hidrocarburos; las condiciones de operación se indican en la Tabla 5.

Tabla 5. Parámetros operacionales para CG-FID en la columna DB-5MS

	Parámetro	Valor
Inyector	Modo	Split
	Radio de Partición	50:1
	Temperatura inicial	250°C
	Tipo de gas	Helio
	Volumen	1 µL
Horno	Temperatura inicial	50 °C
	Tiempo inicial	3 min
	Rampa	3 °C/min
	Temperatura final	210 °C
	Tiempo final	3 min
Columna	Capilar DB-5MS	
	Temperatura máxima	350°C
	Modo	Flujo constante
	Flujo inicial	0.9 mL/min
	Presión inicial nominal	11.10 psi
	Velocidad promedio	24 cm/seg
	Presión de salida	Ambiente
Detector	Ionización de llama	
	Temperatura	260°C
	Tipo de gas	Nitrógeno

Fuente: Agilent Technologies

Elaboración: Rosales, Verónica

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

Para la corrida cromatográfica por Cromatografía de Gases acoplada al detector de llama CG-FID, en columna HP-INNOWAX, se inyectaron los hidrocarburos y las muestras de aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii*, en la Tabla 6 se inidican las condiciones de operación.

Tabla 6. Parámetros operacionales para CG-FID en la columna HP-INNOWAX

	Parámetro	Valor
Inyector	Modo	Split
	Radio de Partición	50:1
	Temperatura inicial	220°C
	Tipo de gas	Hidrógeno
	Volumen	1 µL
Horno	Temperatura inicial	50 °C
	Tiempo inicial	2,5 min
	Rampa	3 °C/min

	Temperatura final	210 °C
	Tiempo final	3 min
Columna	Capilar HP-INNOWAX	
	Temperatura máxima	270°C
	Modo	Flujo constante
	Flujo inicial	0.9 mL/min
	Presión inicial nominal	11.10 psi
	Velocidad promedio	24 cm/seg
	Presión de salida	Ambiente
Detector	Ionización de llama	
	Temperatura	260°C
	Tipo de gas	Nitrógeno

Fuente: Agilent Technologies

Elaboración: Rosales, Verónica

2.1.5.1.6. Identificación de los compuestos químicos

La información cromatográfica cualitativa depende del conocimiento previo de la composición de las muestras; a pesar de los inconvenientes del método, la cromatografía de gases en combinación con otras técnicas es el instrumento más eficaz conocido hasta la fecha para determinar la composición cualitativa de mezclas complejas de compuestos orgánicos (Olguín Pérez y Rodríguez Magadán 2004).

El empleo de varias columnas reduce la probabilidad de identificación errónea, más marcadamente cuando las columnas tienen comportamiento muy diferente.

La utilización de los datos basados en el tiempo de retención puede resultar un método adecuado para la identificación de ciertos compuestos o mezclas relativamente simples, pero para analizar productos naturales de extrema complejidad, los resultados obtenidos carecen de precisión cualitativa (Olguín Pérez y Rodríguez Magadán 2004).

Cada componente de una muestra suministra tres unidades de información: posición, altura y anchura de los picos en el cromatograma. La posición que indican los componentes de la muestra, se expresa como tiempo de retención y suministra la información cualitativa, mientras que las otras dos unidades proporcionan la información cuantitativa.

Para una información cuantitativa más confiable se integraron los compuestos a través del sistema de integración (Chemstation Integratorauto1.e), y así trabajar con los picos integrados.

La cuantificación de los compuestos identificados por cromatografía FID expresada como porcentaje corresponde al área de cada pico detectado, así, se ajustó el tiempo de retención, con el 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.

2.1.5.1.7. Índices de Kovats

La identificación de los compuestos presentes se realiza en base a la comparación de los tiempos de retención con patrones específicos, utilizando el índice de Kovats, y los análisis de los espectros de masa obtenidos para cada pico y registrados en el cromatograma se comparan con los espectros de masa de los compuestos presentes en la biblioteca del CG-EM. (Soto et al. 2011)

El índice de Kovats es un índice de retención que describe el comportamiento de retención de un compuesto de interés comparativamente al de una mezcla de hidrocarburos saturados, alcanos, de diferente número de carbono. El IK expresa el número de átomo de carbono multiplicado por 100, de un alcano hipotético de cadena normal que tendría un tiempo de retención ajustado idéntico al pico de interés cuando es analizado sobre condiciones idénticas (Soto et al. 2011).

Los índices de Kovats experimentales se calcularon por comparación de tiempos de retención de los hidrocarburos (C₁₀ – C₂₅) con relación al tiempo de retención de los compuestos, conforme la siguiente formula:

$$Ik = 100n + 100 * \frac{(t_{Rx} - t_{Rn})}{(t_{RN} - t_{Rn})}$$

Donde:

Ik = Índice de kóvats

n = Número de átomos de carbono en el *n*-alcano

t_{Rx} = Tiempo de retención del compuesto estudiado, que eluye en el centro de los *n*- alcanos.

t_{Rn} = Tiempo de retención del *n*-alcano, que eluye antes del compuesto estudiado.

t_{RN} = Tiempo de retención del *n*-alcano, que eluye después del compuesto estudiado

Los compuestos identificados en base a los IK determinados experimentalmente, tanto para la corrida cromatográfica en columna polar y en columna apolar, se compararon con los valores reportados en Adams (2009) Eessential Oil Components by CG/MS y también en bases de datos electrónicas como Pherobase, (NIST) National Institute of Standards and Technology, de tal manera que la diferencia entre el IK calculado y el leído sea menor o igual a 25 unidades. El límite permitido de diferencia es que sea menor a 50 unidades.

Los compuestos generan un espectro de masas característico, esto proporciona la información estructural sobre la molécula analizada. Estos espectros de masa son analizados para cada componente por la base de datos del equipo, para de esta manera comparar con la colección de espectros de la librería Wiley 7n.1.; se seleccionaron los que tuvieron un grado de correspondencia mayor al 90%. El CAS de cada componente también ayudó a facilitar la búsqueda e identificación en las bases de datos disponibles.

2.1.6. Determinación de la actividad biológica

El surgimiento de cepas resistentes a antibióticos ha resultado en un serio problema de salud, exigiendo la búsqueda de nuevas fuentes, encontrándose en los aceites esenciales un alto potencial para ello (Ochoa Pumaylle et al. 2012).

Para comprobar la actividad biológica del aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii* se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), en 7 cepas bacterianas ATCC (American Type Culture Collection), por el método de microdilución en caldo usando una concentración final de 5×10^5 ufc/mL y una concentración final de 5×10^4 esporas/mL para hongos dermatofitos [*Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185)].

La **CMI** se define como la concentración más baja de sustancia que previene el crecimiento, la cual se determina por la presencia de turbidez después de 24 horas de incubación para bacterias o de crecimiento micelial después de 96 horas de incubación para hongos.

2.1.6.1. Actividad antibacteriana

Para evaluar la actividad antimicrobiana del aceite obtenido de *Sarcorhachis sydowii* se emplearon 2 bacterias Gram Positivas [*Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)] y 5 bacterias Gram Negativas [*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC9997), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2)]

2.1.6.1.1. Método de Microdilución en caldo

Este método se basa en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (García Rodríguez et al. 2000).

2.1.6.1.2. Preparación de la muestra

Se preparó una solución de aceite en DMSO (Dimetil sulfóxido), tomando 980µL de DMSO y 20µL del aceite esencial, equivalente a una concentración de 20mg/mL.

2.1.6.1.3. Preparación del cultivo Overnight (Bacterias)

Se colocan 30µL de cada cepa bacteriana en los medios de cultivo adecuados para cada una de las cepas, que se encontraban almacenadas en reservas criogénicas a -80°C, se las inoculó y se las encubó por 14 -16 horas a 37°C. En la tabla 7 se indican las condiciones de crecimiento para las bacterias usadas.

Tabla 7. Condiciones de crecimiento de las bacterias

Bacterias	Medio de Crecimiento	Condiciones de Incubación
<i>Enterococcus faecalis</i>	(BHI) Caldo Cerebro .Corazón	37 °C por 14-16 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	(TSC) Caldo Tripticasa Soya	37 °C por 14-16 h
<i>Klesiella pneumoniae</i>	(TSC) Caldo Tripticasa Soya	37 °C por 14-16 h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(TSC) Caldo Tripticasa Soya	37 °C por 14-16 h
<i>Escherichia coli</i>	(TSC) Caldo Tripticasa Soya	37 °C por 14-16 h
<i>Proteus vulgaris</i>	(CMH) Caldo Mueller Hilton	37 °C por 14-16 h
<i>Salmonella tiphymurium</i>	(OXOID) Caldo Nutritivo Oxoid	37 °C por 14-16 h

Fuente: American Type Culture Collection

2.1.6.1.3.1. Inoculación

Al día siguiente de la incubación del cultivo Overnight, se transfirió 150 – 300µL a un tubo que contenía 7mL de suero fisiológico estéril ajustando el inóculo a una concentración equivalente a 0,5 en la escala de MacFarland.

Luego, se la suspensión en solución salina se tomó 140µL y se inoculó en 6,86mL de Caldo Mueller Hilton, ajustando a una población bacteriana de 2×10^6 ufc/mL. De la suspensión

resultante se transfirieron 100µL a la placa de cultivo para completar un volumen final de 200µL, de tal forma que en cada pocillo la concentración final fue de 5×10^5 ufc/mL.

2.1.6.1.4 Procedimiento

El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos y se empleó el procedimiento de dilución doble seriada para obtener concentraciones desde 1000µg/ml a 7,81µg/ml. Se transfirió 180µL de CMH a cada pocillo de la primera fila, seguido se colocó 100µL a los pocillos restantes, posteriormente se transfirió 20µL de la solución de aceite diluido a cada pocillo de la primera fila, excepto a los últimos pocillos, los cuales se utilizaron como control positivo (gentamicina para cinco bacterias con un valor de CMI de 0,39µg/mL, mientras que se usó ampicilina como control positivo para *E. faecalis*, con un valor de CMI de 3,12µg/mL.

Se mezcló el medio con el aceite y se procedió a realizar diluciones seriadas, se pipeteó de 15 a 20 veces la solución del primer pocillo del cual se tomó 100µL y se diluyó con 100µL del pocillo siguiente, este proceso se realizó hasta obtener 8 diluciones consecutivas, así la concentración final de la solución de aceite fue de 1000 a 7,81µL. El mismo proceso fue aplicado para los controles positivo, negativo y el de esterilidad.

Finalmente ya preparada la placa de microdilución se inoculó con 100µL de la suspensión del inóculo bacteriano en todos los pocillos excepto en el control de esterilidad, completando así un volumen final de 200µL, para cada pocillo; ajustando la población bacteriana a 5×10^5 ufc/mL. Las placas se sellaron y se incubaron a 37 °C por 18 a 24 h, para su posterior lectura.

2.1.6.2. Actividad antifúngica

La actividad antifúngica del aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii*, frente a hongos dermatofitos *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophyte*; al igual que en la actividad antibacteriana se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria aplicando el método de microdilución en caldo.

2.1.6.2.1 Método de Microdilución en caldo

Este método está descrito en la actividad antibacteriana en el numeral 2.1.6.1.1.

2.1.6.2.2. Preparación de la muestra

Al igual que en lo descrito en las pruebas bacterianas en el numeral 2.1.6.1.2. se preparó una solución de aceite diluido, tomando 980µL de DMSO y 20µL del aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii*.

2.1.6.2.3. Preparación de la Suspensión de los Inóculos Fúngicos

Se preparó la suspensión de los hongos dermatofitos *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185), a partir de una reserva criogénica a -80°C. Se transfirió una cantidad adecuada del criotubo a un volumen de medio Sabouraud para obtener una concentración de 1×10^5 esporas/mL. A partir de este inóculo se siembran 100mL/posillo, la concentración final fue de 5×10^4 esporas/mL.

2.1.6.2.4. Procedimiento

Se empleó el mismo procedimiento de dilución doble seriada que se utilizó para bacterias, cambiando en la concentración final del inóculo, que en hongos esporulados es de 5×10^4 esporas/mL. La concentración final del aceite fue de 1000 a 7,81µg/mL, las diluciones se realizaron hasta obtener 12 diluciones consecutivas, y de la suspensión del inóculo fúngico se tomaron 100µL, para completar a 200µL el volumen final de la placa de cultivo.

Para dermatofitos se empleó como control positivo el Itraconazol con un valor de CMI de 0,48µg/mL y como control negativo se usó DMSO.

Finalmente se incuban las placas a 28°C y se monitorea el crecimiento hasta las 96 horas.

2.1.7. Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante puede ser usada para caracterizar matrices complejas de materiales vegetales, la cual se relaciona con compuestos que pueden proteger un sistema biológico de la excesiva oxidación (Mesa et al. 2011).

Para determinar la actividad antioxidante del aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii*, se utilizaron dos métodos espectrofotométricos y los resultados se expresaron como valores TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) mediante la construcción de una curva patrón usando como antioxidante TROLOX.

El primer método es el del ácido 2,2-azinobis-(3- etilbenzotioazolín-6-sulfónico) (ABTS⁺), el cual está basado en la captación de los antioxidantes por el radical catión ABTS⁺, generado en el medio de reacción, usando como patrón el ácido 6-hidroxi- 2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico (Trólox), un análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E. Este radical catión ABTS⁺ posee una coloración verde-azulada con un promedio de absorción entre 415nm y 820nm. (Granados Conde et al. 2012)

El segundo método se basa en la reducción del radical DPPH[•] (2,2-difenil-1- picrilhidracilo) por los compuestos antioxidantes de la muestra del AE. El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra conteniendo sustancias antioxidantes. La decoloración del radical se determina a 515nm y la cuantificación se realiza por lo general, empleando soluciones patrón de Trólox. (Granados Conde et al. 2012).

Previamente se prepararon 5 mL de solución a diferentes concentraciones, desde 5 a 200ppm del aceite esencial en metanol.

2.1.7.1. Método ABTS

2.1.7.1.1. Solución ABTS

Se pesó 0,1015g de ABTS y 0,01757g de persulfato de potasio (K₂S₂O₈), cada sustancia se colocó en balones de aforo de 25 mL y se aforaron con agua destilada respectivamente, luego se mezcló los reactivos y se dejó reaccionar por 12 horas (proteger de la luz), a esta solución se le llama solución patrón.

Para preparar la solución de trabajo se toma 2,5mL de la solución patrón y 150 mL de Metanol a esta mezcla se le mide la absorbancia a 734nm ajustando hasta obtener una lectura de $1,1 \pm 0,02$

2.1.7.1.2. Lectura de muestras ABTS

A partir de la solución concentrada de 200ppm se preparó soluciones diluidas a diferentes concentraciones entre 100, 50, 25, 12,5; 5 y 0 ppm. De cada una de las soluciones preparadas se tomó 150µL del aceite diluido y se colocó en tubos de ensayo donde se le adicionó 2850µL de la solución de trabajo ABTS, se dejó reposar por 2 horas en oscuridad y se midió la absorbancia a 734nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

2.1.7.1.3. Curva estándar Trólox para ABTS

Se pesa 0,025g de Trólox, se coloca en un balón de aforo de 100mL y se afora con metanol, de esta solución se toma alícuotas de 0,25; 1,5; 3, 4,5; 6 y 8mL y se adiciona metanol hasta completar 10mL.

Luego para la reacción se tomó 150µL de cada alícuota y 2850µL de la solución de trabajo, se dejó 2 horas en oscuridad y luego se procedió a leer la absorbancia a 734nm. Se realizó por triplicado.

Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición usando la siguiente ecuación.

$$\%Inh = \left[1 - \frac{A_{muestra} - A_{blanco}}{A_{referencia}} \right] \times 100 \quad (1)$$

2.1.7.2. Método DPPH

2.1.7.2.1. Solución de DPPH

Se pesó 0,024g de DPPH y colocó en un balón de aforo de 100mL y se aforó con metanol, a esta solución se le llama solución patrón, de la cual se tomó 25mL y se adicionó 107mL de metanol para formar la solución de trabajo, a la cual se le midió la absorbancia a 515nm ajustando hasta obtener una lectura de $1,1 \pm 0,02$.

2.1.7.2.2. Lectura de muestras DPPH

A partir de la solución concentrada de 200 ppm se prepara soluciones diluidas a diferentes concentraciones entre 100, 50, 25, 12,5; 5 y 0 ppm. De cada una de las soluciones preparadas se tomó 150µL del aceite diluido y se llevó a tubos de ensayo donde se le adicionó 2850µL de la solución de trabajo DPPH, se dejó reposar por 24 horas en oscuridad y se midió la absorbancia a 515nm. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición (%Inh), con la ecuación (1).

2.1.7.2.3. Curva estándar Trólox para DPPH

Se pesa 0,025g de Trólox, se coloca en un balón de aforo de 100mL y se afora con metanol, de esta solución se toma alícuotas de 0,25; 1,5; 3, 4,5; 6 y 8mL y se adiciona metanol hasta completar 10mL.

Luego para la reacción se tomó 150 μ L de cada alícuota y 2850 μ L de la solución de trabajo, se dejó 24 horas en oscuridad y luego se procedió a leer la absorbancia a 515nm. Se realizó por triplicado.

Con los valores obtenidos de % Inh, se calcula el valor de la concentración media inhibitoria (CI₅₀) de la muestra. El CI₅₀ de cada aceite se determinará realizando una gráfica de concentración (ppm) versus el 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 ambos métodos (ABTS^{•+} y DPPH) se usa como solución estándar Trólox, cuya capacidad antioxidante se evalúa en las mismas condiciones de trabajo de las muestras. Luego, los resultados de CI₅₀ de los aceites son expresados como capacidad antioxidante equivalente al Trólox (TEAC: μ mol de Trolox/g de AE).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Humedad

El porcentaje de humedad de la materia vegetal se presenta en la Tabla 8. En esta tabla se revela el valor promedio (\bar{X}), desviación estándar y coeficiente de variación obtenidos de las tres destilaciones.

Tabla 8. Porcentaje de Humedad en *Sarcorhachis sydowii*

Código	Humedad (%)	\bar{X}	Σ	C.V.
SS1	76,83	76,41	±0,41	0,53
SS2	76,38			
SS3	76,02			

SS: *Sarcorhachis sydowii* ; 1 Primera recolección; 2 Segunda recolección; 3 Tercera Recolección.
 \bar{X} : Media aritmética correspondiente a las recolecciones
 σ : Desviación estándar
 CV: Coeficiente de Variación

Fuente: Investigación directa

Elaboración: Rosales, Verónica

El valor más alto de humedad corresponde al de la primera recolección (76,83%) y el más bajo al de la tercera recolección (76,02%), estas variaciones de humedad se dan por las condiciones ambientales, ya que la humedad depende de muchos factores como la humedad atmosférica, el estado fenológico de las muestras recolectadas, etc.

Las plantas aromáticas tienen humedades que oscilan entre 75-80% en estado fresco (Caicedo y Otavolo, 2007).

3.2. Rendimiento

El rendimiento del aceite esencial extraído de *Sarcorhachis sydowii*, se indica en la Tabla 9, el promedio del rendimiento para cada recolección resulta de la media de las tres repeticiones.

Tabla 9. Rendimiento del aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii*

Código	Peso (g)	Volumen (ml)	Rendimiento (%)	\bar{X}	σ	C.V.
SS1	6300	3,5	0,06	0,06	±0,01	0.16

SS2	6987	4,9	0,07			
SS3	6066	3,6	0,06			
SS: <i>Sarcorhachis sydowii</i> ; 1 Primera recolección; 2 Segunda recolección; 3 Tercera Recolección. \bar{X} : Media aritmética correspondiente a las destilaciones σ : Desviación estándar CV: Coeficiente de Variación						

Fuente: Investigación directa

Elaboración: Rosales, Verónica

La tabla indica la relación peso/volumen que determina el rendimiento del aceite esencial, revelando que el porcentaje de rendimiento más alto (0,07%) se obtuvo de 6,987kg de materia vegetal con un volumen de 4,9mL de aceite esencial obtenido. El rendimiento se puede ver afectado por el estado fenológico de la planta, y también a las condiciones de destilación.

Según el organismo de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED Argentina), los valores de rendimiento menores a 5mL/kg se consideran bajos, valores entre 5mL/kg y 10 mL/kg intermedios y valores superiores a 10mL/kg altos (Molares et al. 2009); es decir de acuerdo a esta categorización el porcentaje de rendimiento (0,06%) obtenido de 6,3kg de *Sarcorhachis sydowii* con un volumen de 3,5mL de aceite es bajo.

Aunque el rendimiento del aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii* no sea alto, su sola presencia confirma el carácter aromático de esta especie de *Piper* y genera posibilidades de su utilidad para diferentes aplicaciones, según la literatura consultada.

3.3. Propiedades físicas

Las propiedades físicas son parámetros utilizados como control de calidad y pureza del aceite esencial obtenido. El análisis de los aceites obtenidos de cada destilación mostró un líquido de color amarillo tenue, tanto para la primera y tercera destilación, mientras que el aceite esencial obtenido de la segunda destilación presentó un color amarillo intenso.

3.3.1. Densidad relativa

La densidad relativa del aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii* se indica en la Tabla 10 con un promedio de las tres destilaciones.

Tabla 10. Densidad relativa del aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii*

Código	ρ (g/cm ³)	\bar{X}
SS1	0,903	0,906
SS2	0,912	
SS3	0,905	

SS: *Sarcorhachis sydowii* ; 1 Primera destilación; 2 Segunda destilación; 3 Tercera destilación.

\bar{X} : Media aritmética correspondiente a las destilaciones

ρ : Densidad promedio de cada destilación

Fuente: Investigación directa

Elaboración: Rosales, Verónica

La densidad determinada del aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii*, es similar a la encontrada en plantas aromáticas como la hierba luisa (0,8733), cedrón (0,9476) y sunfo (0,9532), datos reportados por (Salazar Mora y Mayanquer Chuga 2009) quienes concluyen que los estados de humedad de las plantas aromáticas si influyen en la densidad de sus aceites esenciales.

3.3.2. Índice de refracción

En la Tabla 11 se revelan los índices de refracción, los mismos que corresponden a los valores promedio de los aceites esenciales obtenidos de cada destilación realizada.

Tabla 11. Índice de refracción del aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii*

Código	Índice de refracción n^{20}	\bar{X}
SS1	0,9045	0,9066
SS2	0,9119	
SS3	0,9034	

SS: *Sarcorhachis sydowii* ; 1 Primera destilación; 2 Segunda destilación; 3 Tercera destilación.

\bar{X} : Media aritmética correspondiente a las destilaciones

Fuente: Investigación directa

Elaboración: Rosales, Verónica

El índice de refracción promedio del aceite esencial obtenido de las tres destilaciones de *Sarcorhachy sydowii* es de 0.9066

Este parámetro es característico de cada aceite y sólo cambia si este se diluye o se mezcla con otras sustancias (Murillo et al. 2014).

En su gran mayoría las esencias vegetales muestran índices de refracción entre 1,40 y 1,61 a 20°C (Murillo et.al 2014) y como se observa en la Tabla 11, el valor encontrado del aceite esencial de *Sarcorrhachis sydownii* difiere ya que es una propiedad característica de cada aceite.

3.4. Composición Química del Aceite Esencial de *Sarcorrhachis sydownii* Trel.

La composición química del AE de *Sarcorrhachis sydownii* fue analizada por CG-EM y CG-FID en columnas DB-5MS y HP-INNOWAX, proporcionando el cromatograma, para su respectiva identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos.

En la figura 9 y 10 respectivamente se exponen los perfiles del cromatograma del aceite esencial de *Sarcorrhachis sydownii* obtenidos en la columna DB-5MS y HP-INNOWAX, mediante la técnica CG-EM conforme a los parámetros operacionales descritos en la metodología.

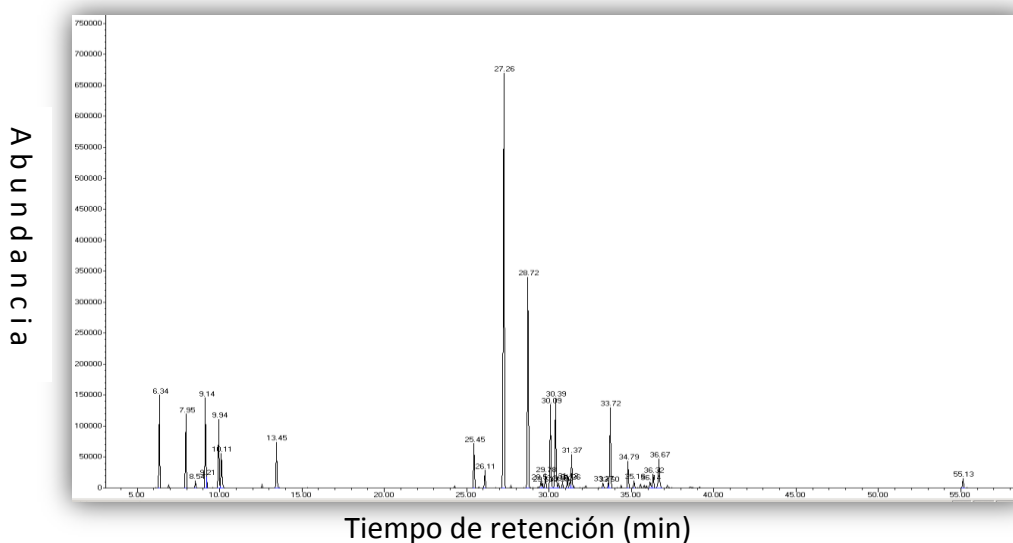


Figura 9. Cromatograma del aceite esencial de *Sarcorrhachis sydownii* en columna DB-5MS

Fuente: Investigación Directa

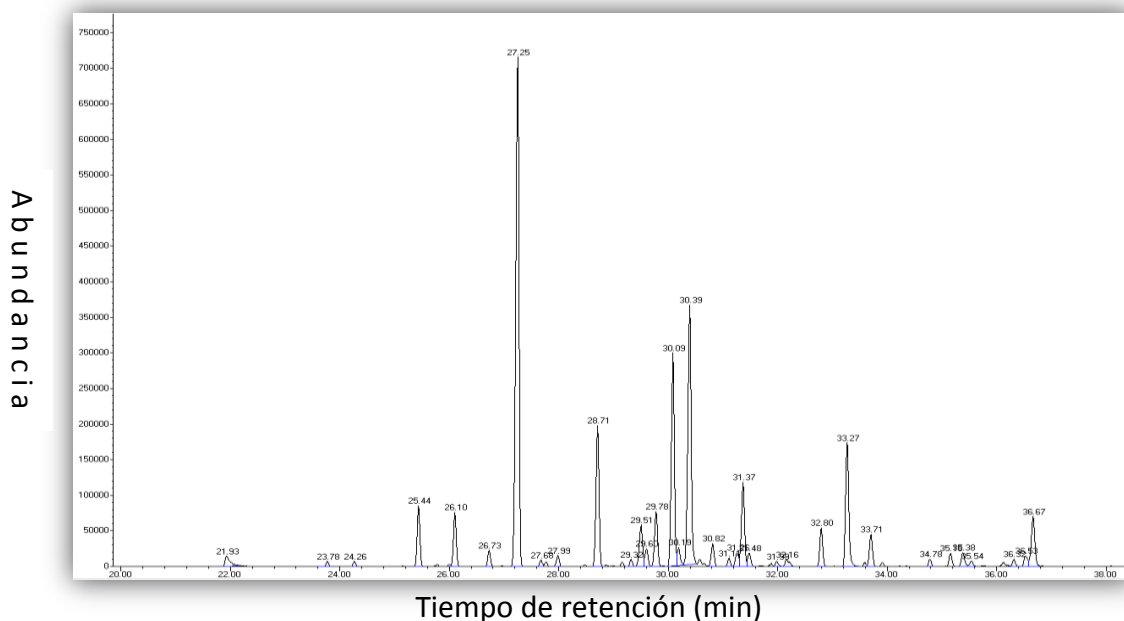


Figura 10. Cromatograma del aceite esencial de *Sarcorhahis sydowii* en columna HP-INNOWAX

Fuente: Investigación Directa

El tamaño de los picos y el tiempo de retención establecen la determinación cuantitativa y cualitativa de un compuesto respectivamente; en los cromatogramas se presentan demasiados picos y muy próximos, por lo que es difícil su identificación total, de tal manera que los compuestos resultantes se integraron para una identificación más efectiva.

Es importante tener en cuenta que el tiempo de retención no es el único que puede determinar la identidad de un compuesto (Agilent Technologies 2010).

En la Figura 9 el cromatograma resultante presenta ciertos picos muy separados, mientras que en el cromatograma de la Figura 10 los picos se observan menos separados. De acuerdo a la guía de selección de columnas (Agilent Technologies 2010) el cromatograma ideal tiene picos con muy poca separación que no se solapan (coelución); esto es importante porque la coelución no permite medir los picos con exactitud, y si dos picos tienen el mismo tiempo de retención, ninguno de ellos se puede identificar exactamente.

3.4.1. Análisis Cualitativo

La identificación cualitativa de los compuestos se realizó comparando los IK (Índices de Kovats) determinados experimentalmente y los IK reportados en la literatura, tanto para la columna DB-5MS como para la columna HP-INNOWAX (columnas apolar y polar

respectivamente). Los espectros de masa de cada compuesto se basaron en la información que nos proporciona la base de datos del equipo (Wiley 7n.1). Y los tiempos de retención experimentales se determinaron en base a la serie homóloga de alcanos (C₁₀ a C₂₅).

En la Tabla 12 se detalla la composición química de los compuestos que se identificaron en el aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii*, los mismos que están dispuestos de acuerdo al orden de elución en la columna DB-5MS. Se indican los IK calculados y referidos, el porcentaje promedio relativo para cada compuesto en las dos columnas (DB-5MS y HP-INNOWAX) correspondiente a cada una de las destilaciones, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Tabla 12. Composición química del aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii*.

PICO	COMPUESTOS	DB-5 MS								HP-INNOWAX MS								
		IK ^{cal}	IK ^{ref}	% de Cantidad Relativa			\bar{x}	σ	C.V.	IK ^{cal}	IK ^{ref}	% de Cantidad Relativa			\bar{x}	Σ	C.V.	
				PSS1	PSS2	PSS3												
1	α -Pinene	933	932	4,11	4,05	3,02	3,73	0,61	0,16	1036	1032	4,16	4,18	3,10	3,81	0,62	0,16	
2	Camphene	947	946	0,12	0,13	0,13	0,00	0,03	1066	1076	0,19	0,12	0,15	0,05	0,32	
3	β -Pinene	973	974	3,54	1,48	2,95	2,66	1,06	0,40	1101	1110	3,67	1,64	3,04	2,78	1,04	0,37	
4	6-Methyl-5-hepten-2-one	985	981	0,24	1341	1348	0,69	
5	Myrcene	988	988	0,35	0,34	0,55	0,42	0,12	0,28	1161	1174	0,49	0,34	0,52	0,45	0,09	0,21	
6	α -Phellandrene	1002	1002	4,70	4,82	6,59	5,37	1,06	0,20	1159	1176	4,77	4,78	6,35	5,30	0,91	0,17	
7	δ -3-Carene	1004	1008	0,45	1141	1148	0,50	0,46	0,48	0,03	0,06	
8	p -Cymene	1021	1020	3,78	2,45	3,99	3,40	0,83	0,24	1269	1278	3,93	2,64	4,13	3,57	0,81	0,23	
9	Limonene	1024	1024	2,22	1,26	2,21	1,90	0,55	0,29	1195	1203	1,87	0,87	1,70	1,48	0,53	0,36	
10	1,8-Cineole	1027	1026	0,15	0,17	0,16	0,01	0,07	1202	1211	0,16	
11	Terpinolene	1081	1086	0,20	0,46	0,33	0,19	0,57	1280	1291	0,33	0,23	0,47	0,34	0,12	0,36	
12	Linalool	1100	1095	2,81	0,35	2,85	2,00	1,43	0,72	1560	1553	3,34	0,60	3,17	2,37	1,54	0,65	
13	Safrole	1287	1285	0,74	
14	α -Cubebene	1341	1345	0,10	0,17	0,22	0,16	0,06	0,36	1452	1464	0,21	0,24	0,21	0,22	0,02	0,08	
15	α -Copaene	1368	1374	2,64	2,27	4,85	3,25	1,40	0,43	1484	1480	2,89	2,62	5,03	3,51	1,32	0,38	
16	β -Bourbonene	1374	1387	0,20	1510	1515	0,19	
17	β -Elemene	1383	1389	1,03	2,23	0,80	1,35	0,77	0,57	
18	α -Gurjunene	1397	1409	0,61	0,20	0,40	0,29	0,73	1521	1538	0,69	0,17	0,43	0,37	0,87	
19	(E)-Caryophyllene	1410	1417	28,12	23,63	23,47	25,07	2,64	0,11	1591	1594	25,22	23,33	24,17	24,24	0,94	0,04	
20	β -Gurjunene	1420	1431	0,13	0,25	0,36	0,25	0,11	0,46	
21	Aromadendrene	1428	1455	0,43	0,25	0,34	0,12	0,37	1597	1617	0,36	
22	α -Humulene	1446	1452	13,97	6,05	11,41	10,48	4,04	0,39	1662	1667	12,67	5,91	11,73	10,10	3,66	0,36	

Tabla 12. Continuación

PICO	COMPUESTOS	DB-5MS								HP-INNOWAX							
				% de Cantidad Relativa								% de Cantidad Relativa					
		IK ^{cal}	IK ^{ref}	PSS1	PSS2	PSS3	\bar{x}	σ	C.V.	IK ^{cal}	IK ^{ref}	PSS1	PSS2	PSS3	\bar{x}	σ	C.V.
23	γ -Muurolene	1467	1478	0,28	0,77	0,40	0,48	0,25	0,52	1682	1675	0,43	0,86	0,45	0,58	0,25	0,43
24	Germacrene-D	1471	1484	0,86	2,35	1,55	1,58	0,74	0,47	1700	1713	0,97	2,39	1,59	1,65	0,71	0,43
25	β -Selinene	1479	1489	5,80	9,66	2,79	6,08	3,44	0,57	1710	1704	5,04	8,38	2,61	5,34	2,90	0,54
26	alpha elemene	1481	1477	0,73	0,31	0,52	0,30	0,57
27	α -Selinene	1486	1494	6,49	12,23	4,01	7,58	4,21	0,56	1715	1727	5,14	9,37	2,69	5,73	3,38	0,59
28	α -Muurolene	1491	1500	0,28	0,46	0,14	0,13	0,89	1718	1714	0,52	0,66	0,46	0,55	0,10	0,19
29	Germacrene A	1497	1508	0,34	0,92	0,44	0,57	0,31	0,55
30	γ -Cadinene	1504	1513	0,44	0,32	0,50	0,42	0,09	0,22
31	δ -Amorphene	1508	1511	0,41	0,59	0,50	0,13	0,25
32	δ -Cadinene	1511	1522	2,23	3,67	3,46	3,12	0,78	0,25	1753	1760	3,25	5,00	3,62	3,96	0,92	0,23
33	(Z)-Calamenene	1514	1528	0,58	0,28	0,43	0,21	0,49	1828	1853	0,55	0,31	0,43	0,17	0,40
34	Eudesma-4(14),7(11)-diene	1526	1522	0,21
35	Selina-3,7(11)-diene	1531	1545	0,42	1769	1796	0,58
36	α -Calacorene	1533	1544	0,14	0,22	0,18	0,06	0,30	1911	1918	0,20	0,24	0,22	0,02	0,11
37	Germacrene-B	1547	1559	1,59	1819	1854	1,65
38	(E)-Nerolidol	1559	1561	0,32	5,60	2,03	2,65	2,69	1,02	2052	2050	0,93	6,20	2,72	3,29	2,68	0,82
39	Germacrene D-4-ol	1569	1574	1,32
40	Caryophyllene oxide	1571	1582	5,36	1,38	5,19	3,98	2,25	0,57	1973	1987	5,26	1,47	5,14	3,96	2,15	0,54
41	Globulol	1577	1590	0,28
42	Viridiflorol	1584	1581	0,23
43	Ledol	1594	1602	0,19
44	Humulene epoxide II	1598	1608	1,70	0,29	1,86	1,28	0,87	0,67	2030	2071	1,88	0,36	1,67	1,31	0,82	0,63

Tabla 12. Continuación

PICO	COMPUESTOS	DB-5MS								HP-INNOWAX							
		IK ^{cal}		IK ^{ref}		% de Cantidad Relativa				IK ^{cal}		IK ^{ref}		% de Cantidad Relativa			
		IK ^{cal}	IK ^{ref}	PSS1	PSS2	PSS3	\bar{x}	Σ	C.V.	IK ^{cal}	IK ^{ref}	PSS1	PSS2	PSS3	\bar{x}	σ	C.V.
45	Dill apiole	1614	1620	0,66	0,98	0,82	0,22	0,27
46	Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5.beta-ol	1628	1639	0,18	0,59	0,39	0,29	0,74
47	epi- α -Cadinol (τ -Cadinol)	1634	1638	0,56	0,46	0,51	0,07	0,14	2189	2187	0,27
48	α -Murolol (torreyol)	1639	1644	1,00	0,31	0,65	0,49	0,75
49	β -Eudesmol	1645	1649	0,56	2230	2246	0,55	0,27	0,41	0,20	0,49
50	α -Cadinol	1649	1652	2,54	2,52	1,88	2,31	0,38	0,16	2235	2243	0,44	0,36	0,40	0,06	0,15
51	Caryophylla-3,8(13)-dien-5.beta-ol	1664	1655	0,75
52	β -Phellandrene	1204	1218	0,41	0,48	0,45	0,05	0,11
53	6-Methyl-5-hepten-2-ol	1466	1467	0,25
54	β -Cubebene	1583	1565	0,35
55	γ -Elemene	1635	1650	0,33
56	γ -Selinene	1669	1690	0,44	1,01	0,23	0,56	0,40	0,72
57	Ledene	1687	1708	0,73
58	Bicyclogermacrene	1725	1748	0,97	1,12	1,04	0,11	0,10
59	Spathulenol	2126	2133	0,41	1,24	0,83	0,59	0,71
60	β -Maaliene	2138	2161	0,64	0,70	0,35	0,56	0,18	0,33
61	Caryophylla-2(12),6(13)-dien-5 β -ol (caryophylladienol-I)	2300	2316	0,58	0,61	0,59	0,02	0,04
				*Total identificado:				95,60					*Total identificado:				91,09

Tabla 12. Continuación

	GRUPOS QUÍMICOS	GRUPOS QUÍMICOS
	Sesquiterpenos Hidrocarbonados: 59,87% Monoterpenos Hidrocarbonados: 17,92% Sesquiterpenos Oxigenados: 11,78% Monoterpenos Oxigenados: 2,16% Otros Compuestos: 3,87%	Sesquiterpenos Hidrocarbonados: 58,13% Monoterpenos Hidrocarbonados: 18,82% Sesquiterpenos Oxigenados: 10,18% Monoterpenos Oxigenados: 2,37% Otros Compuestos: 1,59%
<p>Compuestos según el orden de elución en la columna DB-5MS. IKcal: índice de Kovats calculado. IKref: índice de Kovats reportado en la literatura. Referencias para IK en columna DB-5MS (Adams 2009). Referencias para IK en columna HP-INNOWAX((De Castro et al. 2007), (Demirci et al. 2003), (Can Baser et al. 2001), (Frizzo et al. 2008))</p> <p>*: Sumatoria del % de cantidad relativa de los compuestos identificados en DB-5MS y HP-INNOWAX</p> <p>PSS1: Aceites de la primera recolección. PSS2: Aceites de la segunda recolección. PSS3: Aceites de la tercera recolección. : no detectado.</p>		

Fuente: Investigación Directa

Elaboración: Rosales, Verónica

Como se indica en la Tabla 12, fue posible identificar 61 compuestos; de los cuales 35 compuestos están presentes en ambas columnas; en la columna DB-5MS se identificaron 51 que representan 95,60% y en la columna HP-INNOWAX se identificaron 45 que representan el 91,09%. Este análisis demostró que el aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii* fue constituido predominantemente por sesquiterpenos hidrocarbonados (59%), seguido de monoterpenos hidrocarbonados (18,37%), sesquiterpenos oxigenados (10,98%), monoterpenos oxigenados (2,27%), entre otros compuestos que conforman (2,73%) del total de compuestos identificados. El componente mayoritario es el Sesquiterpeno (E)-caryophyllene (25,07%), seguido de α -humulene (10,48%), α -selinene (7,58%) y β -selinene (6,08%), y algunos monoterpenos tales como el α -phellandrene (5,37%), α -pinene (3,73%). Estudios realizados por Nigam y Purohit (1962) al género *Piper* acerca de su composición confirman como constituyentes principales fenilpropanoides, monoterpenoides y sesquiterpenoides.

3.4.2. Análisis Cuantitativo

Para el análisis cuantitativo se realizó la comparación del porcentaje de cantidad relativa de los picos detectados en FID con el porcentaje de cantidad relativa de los picos de los compuestos identificados en masas, el resultado se presenta en la Tabla 13, comprobando la presencia de los compuestos encontrados.

Tabla 13. Cantidad relativa de la composición química del aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii*.en DB-5 & HP-INNOWAX (MS) y DB-5 & HPINNOWAX (FID)

PICO	COMPUESTOS	DB-5										HP-INNOWAX									
		% de Cantidad Relativa										% de Cantidad Relativa									
		PSS1		PSS2		PSS3		MASAS		FID		PSS1		PSS2		PSS3		MASAS		FID	
		MS	FID	MS	FID	MS	FID	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	MS	FID	MS	FID	MS	FID	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
1	α -Pinene	4,11	4,51	4,05	4,78	3,02	3,36	3,73	0,61	4,22	0,75	4,16	4,61	4,18	4,82	3,10	3,45	3,81	0,62	4,29	0,74
2	Camphene	0,12	0,23	0,13	0,15	0,13	0,00	0,19	0,06	0,19	0,21	0,12	0,14	0,15	0,05	0,18	0,05
3	β -Pinene	3,54	4,29	1,48	1,99	2,95	3,59	2,66	1,06	3,29	1,18	3,67	4,38	1,64	2,01	3,04	3,66	2,78	1,04	3,35	1,22
4	6-Methyl-5-hepten-2-one	0,24	0,25	0,69	0,96
5	Myrcene	0,35	0,42	0,34	0,38	0,55	0,52	0,42	0,12	0,44	0,07	0,49	0,26	0,34	0,23	0,52	0,48	0,45	0,09	0,32	0,14
6	α -Phellandrene	4,70	4,22	4,82	4,96	6,59	6,63	5,37	1,06	5,27	1,24	4,77	5,46	4,78	5,47	6,35	7,30	5,30	0,91	6,07	1,06
7	δ -3-Carene	0,45	0,66	0,50	0,56	0,46	0,53	0,48	0,03	0,54	0,02
8	p -Cymene	3,78	2,73	2,45	2,01	3,99	3,08	3,40	0,83	2,61	0,55	3,93	3,50	2,64	2,44	4,13	3,73	3,57	0,81	3,22	0,69
9	Limonene	2,22	2,81	1,26	1,62	2,21	2,74	1,90	0,55	2,39	0,67	1,87	2,16	0,87	1,05	1,70	1,99	1,48	0,53	1,73	0,60
10	1,8-Cineole	0,15	0,16	0,17	0,12	0,16	0,01	0,14	0,03	0,16	0,19
11	Terpinolene	0,20	0,24	0,46	0,38	0,33	0,19	0,31	0,10	0,33	0,35	0,23	0,27	0,47	0,52	0,34	0,12	0,38	0,12
12	Linalool	2,81	2,60	0,35	0,29	2,85	2,79	2,00	1,43	1,89	1,40	3,34	3,99	0,60	0,76	3,17	3,81	2,37	1,54	2,85	1,81
13	Safrole	0,74	0,32
14	α -Cubebene	0,10	0,20	0,17	0,19	0,22	0,22	0,16	0,06	0,20	0,01	0,21	0,20	0,24	0,24	0,21	0,22	0,22	0,02	0,22	0,02
15	α -Copaene	2,64	2,38	2,27	2,263	4,85	4,16	3,25	1,40	2,93	1,06	2,89	2,29	2,62	2,17	5,03	4,07	3,51	1,32	2,84	1,07
16	β -Bourbonene	0,20	0,2	0,19	0,22
17	β -Elemene	1,03	1,30	2,23	2,68	0,80	0,91	1,35	0,77	1,63	0,93
18	α -Gurjunene	0,61	0,66	0,20	0,22	0,40	0,29	0,44	0,31	0,69	0,61	0,17	0,16	0,43	0,37	0,39	0,32
19	(E)-Caryophyllene	28,12	27,92	23,63	24,71	23,47	26,29	25,07	2,64	26,31	1,61	25,22	27,22	23,33	22,67	24,17	26,25	24,24	0,94	25,38	2,40
20	β -Gurjunene	0,13	0,22	0,25	0,58	0,36	0,39	0,25	0,11	0,40	0,18

Tabla 13. Continuación

PICO	COMPUESTOS	DB-5										HP-INNOWAX									
		% de Cantidad Relativa										% de Cantidad Relativa									
		PSS1		PSS2		PSS3		MASAS		FID		PSS1		PSS2		PSS3		MASAS		FID	
		MS	FID	MS	FID	MS	FID	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	MS	FID	MS	FID	MS	FID	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
21	Aromadendrene	0,43	0,51	0,25	0,20	0,34	0,12	0,35	0,22	0,36	0,37
22	α -Humulene	13,97	13,27	6,05	6,07	11,41	11,94	10,48	4,04	10,43	3,83	12,67	12,62	5,91	5,82	11,73	11,68	10,10	3,66	10,04	3,68
23	γ -Muuroolene	0,28	0,35	0,77	0,71	0,40	0,29	0,48	0,25	0,45	0,22	0,43	0,41	0,86	0,77	0,45	0,43	0,58	0,25	0,54	0,20
24	Germacrene-D	0,86	0,91	2,35	2,23	1,55	1,50	1,58	0,74	1,55	0,66	0,97	0,98	2,39	2,30	1,59	1,93	1,65	0,71	1,73	0,68
25	β -Selinene	5,80	5,38	9,66	9,68	2,79	2,95	6,08	3,44	6,00	3,41	5,04	4,50	8,38	7,96	2,61	2,31	5,34	2,90	4,92	2,85
26	alpha elemene	0,73	0,26	0,31	0,38	0,52	0,30	0,32	0,09
27	α -Selinene	6,49	5,58	12,23	11,06	4,01	4,05	7,58	4,21	6,90	3,69	5,14	4,62	9,37	9,62	2,69	2,37	5,73	3,38	5,54	3,71
28	α -Muuroolene	0,28	0,44	0,46	0,24	0,37	0,13	0,34	0,14	0,52	0,45	0,66	0,58	0,46	0,41	0,55	0,10	0,48	0,09
29	Germacrene A	0,34	0,33	0,92	0,61	0,44	0,42	0,57	0,31	0,45	0,14
30	γ -Cadinene	0,44	0,52	0,32	0,33	0,50	0,37	0,42	0,09	0,41	0,10
31	δ -Amorphene	0,41	0,42	0,59	0,30	0,50	0,13	0,36	0,08
32	δ -Cadinene	2,23	2,31	3,67	3,44	3,46	2,82	3,12	0,78	2,86	0,57	3,25	2,62	5,00	4,20	3,62	2,94	3,96	0,92	3,25	0,83
33	(Z)-Calamenene	0,58	0,31	0,28	0,22	0,43	0,21	0,26	0,06	0,55	0,41	0,31	0,24	0,43	0,17	0,33	0,12
34	Eudesma-4(14),7(11)-diene	0,21	0,24
35	Selina-3,7(11)-diene	0,42	0,32	0,58	0,55
36	α -Calacorene	0,14	0,196	0,22	0,17	0,18	0,06	0,18	0,02	0,20	0,38	0,24	0,21	0,22	0,02	0,29	0,12
37	Germacrene-B	1,59	1,64	1,65	1,60
38	(E)-Nerolidol	0,32	0,153	5,60	5,80	2,03	2,06	2,65	2,69	2,67	2,87	0,93	0,73	6,20	5,92	2,72	2,27	3,29	2,68	2,97	2,67
39	Germacrene D-4-ol	1,32	1,27
40	Caryophyllene oxide	5,36	5,3	1,38	1,52	5,19	5,30	3,98	2,25	4,04	2,18	5,26	4,99	1,47	1,45	5,14	4,90	3,96	2,15	3,78	2,02

Tabla 13. Continuación

PICO	COMPUESTOS	DB-5										HP-INNOWAX									
		% de Cantidad Relativa										% de Cantidad Relativa									
		PSS1		PSS2		PSS3		MASAS		FID		PSS1		PSS2		PSS3		MASAS		FID	
		MS	FID	MS	FID	MS	FID	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	MS	FID	MS	FID	MS	FID	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
41	Globulol	0,28	0,42
42	Viridiflorol	0,23	0,28
43	Ledol	0,19	0,18
44	Humulene epoxide II	1,70	1,91	0,29	0,19	1,86	1,83	1,28	0,87	1,31	0,97	1,88	1,78	0,36	0,40	1,67	1,60	1,31	0,82	1,26	0,75
45	Dill apiole	0,66	0,60	0,98	0,44	0,82	0,22	0,52	0,12
46	Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5.beta-ol	0,18	0,135	0,59	0,52	0,39	0,29	0,33	0,27
47	epi- α -Cadinol (τ -Cadinol)	0,56	0,449	0,46	0,57	0,51	0,07	0,51	0,09
48	α -Murolol (torreyol)	1,00	0,969	0,31	0,40	0,65	0,49	0,68	0,41
49	β -Eudesmol	0,56	0,67	0,55	0,43	0,27	0,26	0,41	0,20	0,34	0,12
50	α -Cadinol	2,54	2,58	2,52	2,21	1,88	1,46	2,31	0,38	2,09	0,57	0,44	0,38	0,36	0,32	0,40	0,06	0,35	0,04
51	Caryophylla-3,8(13)-dien-5.beta-ol	0,75	0,28
52	β -Phellandrene	0,41	0,61	0,48	0,56	0,45	0,05	0,59	0,04
53	6-Methyl-5-hepten-2-ol	0,25	0,27
54	β -Cubebene	0,35	0,36
55	γ -Elemene	0,33	0,59
56	γ -Selinene	0,44	0,43	1,01	1,53	0,23	0,26	0,56	0,40	0,74	0,69
57	Ledene	0,73	0,64
58	Bicyclogermacrene	0,97	0,96	1,12	1,09	1,04	0,11	1,02	0,09
59	Spathulenol	0,41	0,36	1,24	1,07	0,83	0,59	0,71	0,50

Tabla 13. Continuación

PICO	COMPUESTOS	DB-5										HP-INNOWAX									
		% de Cantidad Relativa										% de Cantidad Relativa									
		PSS1		PSS2		PSS3		MASAS		FID		PSS1		PSS2		PSS3		MASAS		FID	
		MS	FID	MS	FID	MS	FID	\bar{x}	Σ	\bar{x}	σ	MS	FID	MS	FID	MS	FID	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
60	β -Maaliene	0,64	0,58	0,70	0,64	0,35	0,36	0,56	0,18	0,53	0,15
61	Caryophylla-2(12),6(13)-dien-5 β -ol (caryophylladienol-I)	0,58	0,54	0,61	0,59	0,59	0,02	0,56	0,04
		*Total Identificado:						95,83		95,66		**Total Identificado:						91,09		91,74	

Compuestos según el orden de elución en la columna DB-5 MS.
PSS1: Aceites de la primera recolección.
PSS2: Aceites de la segunda recolección.
PSS3: Aceites de la tercera recolección.
*: Sumatoria del % de cantidad relativa en la columna DB-5ms -MS y DB-5ms FID.
**: Sumatoria del % de cantidad relativa en la columna HP-INNOWAX-MS y HP-INNOWAX FID

Fuente: Investigación Directa

Elaboración: Rosales, Verónica

3.5. Actividad Biológica

Los resultados de CMI tanto para bacterias como para hongos, de los aceites obtenidos de las destilaciones de *Sarcorhachis sydowii* se exponen en la Tabla 14.

Tabla 14. Concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$) de los aceites esenciales de *Sarcorhachis sydowii*.

Microorganismo	Muestras de aceite			
	PSS1	PSS2	PSS3	
	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			
GRAM NEGATIVAS				
BACTERIAS	<i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC 27853)	>1000	>1000	>1000
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 9997)	>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
	GRAM POSITIVAS			
	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	>1000	>1000	>1000
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC25923)	>1000	>1000	>1000
HONGOS	<i>Trichophyton rubrum</i> (ATCC 28188)	500	500	1000
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (ATCC 28185)	500	500	1000

Control positivo: **Gentamicina** (CMI: 0,39 $\mu\text{g/mL}$) para *P. aeruginosa*, *K. pneumonia*, *P. vulgaris*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*; **Ampicilina** (CMI: 3,12 $\mu\text{g/mL}$) para *E. faecalis* y *S. aureus* y para hongos **Itraconazol** (CMI: 0,48 $\mu\text{g/mL}$)
PSS: Código de las muestras de aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii*

Fuente: Investigación directa

Elaboración: Rosales, Verónica

La literatura científica menciona que la actividad antimicrobiana presentada por los aceites esenciales se debe principalmente a la presencia de terpenoides especialmente los que contienen grupos alcoholes, luego los que poseen grupos aldehídos y por último los que contienen grupos cetónicos (Sánchez et al. 2009), también junto a otros autores plantean que algunos aceites con un alto porcentaje de compuestos monoterpénicos poseen significativas propiedades antimicrobianas.

Según Jiang (2011) la complejidad de la composición química es lo que dificulta explicar la actividad biológica del aceite esencial (Ochoa Pumaylle et al. 2012). Por otra parte, se ha demostrado que la actividad biológica en la mayoría de los aceites esenciales es debida a la presencia y contribución principal de compuestos de origen terpenoidal e hidrocarburos saturados (Lanza et al. 2010).

La actividad biológica del aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii* a diferentes concentraciones no mostró actividad antibacteriana frente a microorganismos Gram positivos ni Gram-negativos, mientras que en la actividad antifúngica los aceites de la primera y segunda recolección mostraron una CMI de 500 ug/mL frente a *T. rubrum* y *T. Mentagrophytes* y los aceites de la tercera recolección presentaron para las dos cepas fúngicas una CMI de 1000µg/mL.

Sin embargo algunos estudios realizados a los aceites esenciales extraídos de plantas de la familia *Piperaceae* han demostrado que poseen actividad antimicrobiana para varias aplicaciones farmacológicas (Pino et al. 2011).

3.6. Actividad Antioxidante

3.6.1. Actividad antioxidante por el método DPPH

La actividad antioxidante es expresada como la capacidad de inhibir la peroxidación del ácido linoleico y atrapar los radicales libres (RL). (Abad D. y Cabezas V. 2014).

En la Tabla 15 se describe las concentraciones de aceite en las soluciones, expresada en (µg/mL) y la absorbancia media obtenida de las lecturas, los ensayos se realizaron por triplicado para cada concentración respectivamente. También se indica el porcentaje de disminución de DPPH calculado con la siguiente ecuación.

$$\%Dism DPPH = \frac{Abs. DPPH - Abs. aceite}{Abs. DPPH}$$

Tabla 15. Concentración, absorbancias medias y porcentaje de disminución del aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii*

Concentración (µg/mL)	Abs. Media	% de disminución DPPH
0	0,74	0,00
5	0,25	66,57
12,5	0,14	81,19
25	0,14	81,37
50	0,13	82,63
100	0,12	83,40
200	0,11	85,02

Fuente: Investigación directa

Elaboración: Rosales, Verónica

La composición química de los aceites esenciales es muy compleja, por lo tanto la actividad antioxidante puede arrojar resultados dispersos dependiendo del método aplicado.

En la Figura 11 se muestra la gráfica correspondiente a la absorbancia y concentración del aceite esencial de *Sarcorhachis sydownii*

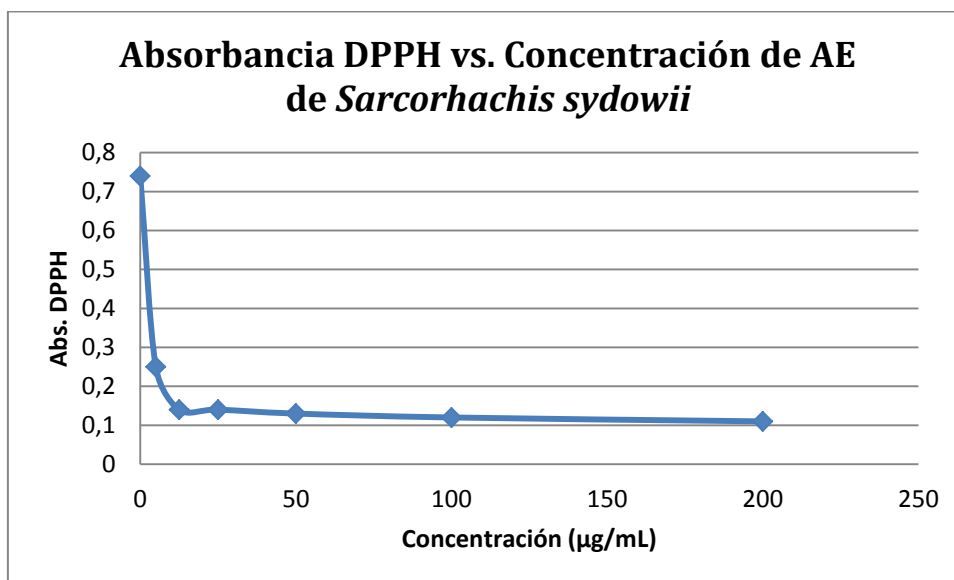


Figura 11. Absorbancia del DPPH frente a las diferente concentraciones de AE de *Sarcorhachis sydownii*.

Fuente: Investigación directa

Elaboración: Rosales, Verónica

La gráfica muestra una relación inversamente proporcional entre la absorbancia y la concentración del aceite esencial de *Sarcorhachis sydownii* , por lo tanto a mayor concentración (ppm) de AE, menor es la absorbancia obtenida.

Para obtener el CI_{50} se relaciona el porcentaje de disminución de DPPH con relación a cada una de las concentraciones del aceite; se obtuvo la ecuación logarítmica al tener una relación geométrica entre las variables que se puede observar en la Figura 12.

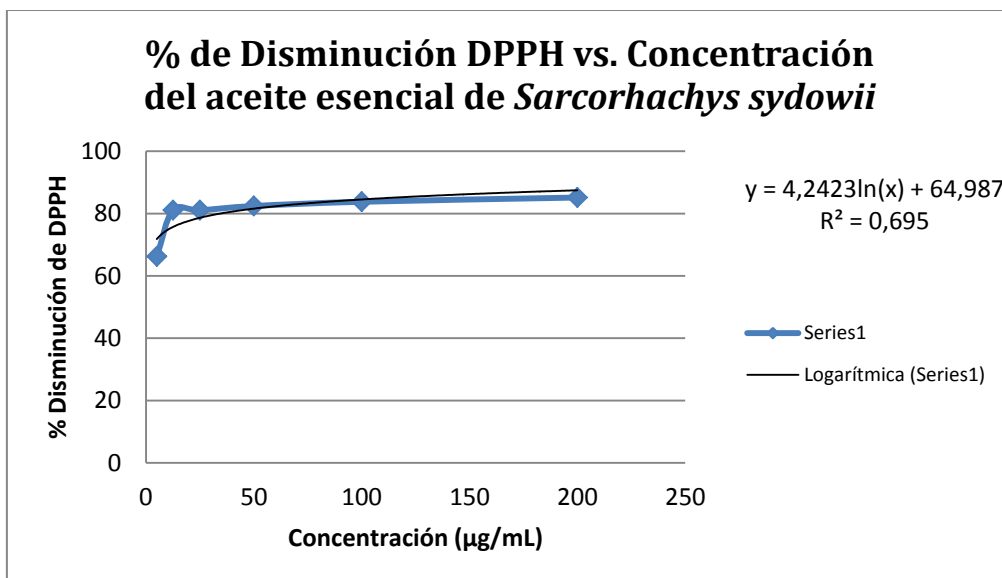


Figura 12. Porcentaje de Disminución del DPPH frente a las diferentes concentraciones de AE de *Sarcorrhachis sydownii*

Fuente: Investigación directa

Elaboración: Rosales, Verónica

Con la ecuación obtenida en la gráfica se determina la actividad antioxidante, por el método DPPH, expresando los resultados como IC₅₀

Así se obtuvo el siguiente resultado:

$$y = 4,0887\ln(x) + 65,604$$

$$x = e^{\frac{50-65,604}{4,0887}}$$

$$x = 0,02 \mu\text{g/mL}$$

La CI₅₀ se define como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH en un 50%.

La CI₅₀ determinado para el aceite esencial de *Sarcorrhachis sydownii* es correspondiente a 0,02 ppm, esto indica que, tiene buena actividad antioxidante, ya que a valores más bajos de CI₅₀ mayor es la actividad antioxidante (Padilla et al. 2008).

3.6.2. Actividad antioxidante por el método ABTS

En la Tabla 16 se describe las concentraciones de aceite de las soluciones, expresada en ($\mu\text{g}/\text{mL}$) y la absorbancia media obtenida de las lecturas, los ensayos se realizaron por triplicado para cada concentración respectivamente. También se indica el porcentaje de disminución de ABTS calculado con la misma ecuación que se utilizó en el método DPPH, indicado en el numeral 3.6.1.

Tabla 16. Concentración, absorbancias medias y porcentaje de disminución del aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii*

Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Abs. Media	% de disminución DPPH
0	0,96	0
5	0,7	27,08
12,5	0,38	60,42
25	0,02	97,92
50	0,01	98,96
100	0,01	98,96
200	0,01	98,96

Fuente: Investigación directa

Elaboración: Rosales, Verónica

En la Figura 13 se muestra la relación entre absorbancia y concentración del aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii*.

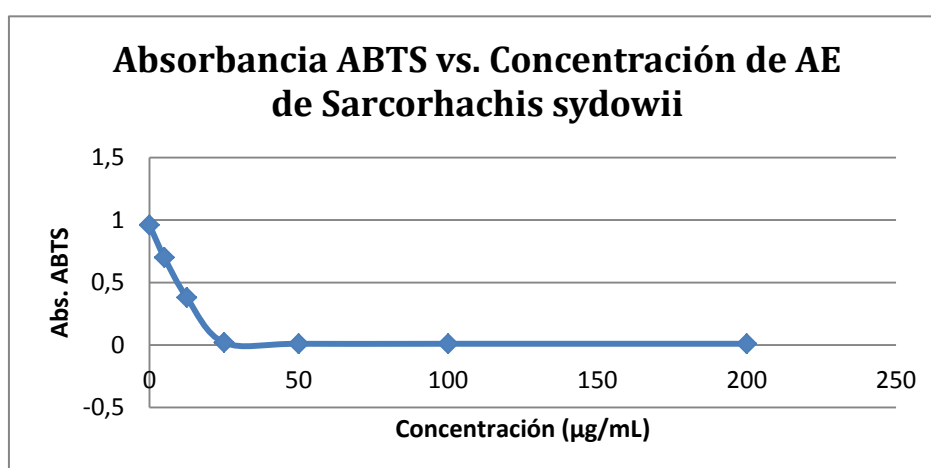


Figura 13. Absorbancia del DPPH frente a las diferentes concentraciones de AE de *Sarcorhachis sydowii*

Fuente: Investigación directa

Elaboración: Rosales, Verónica

La gráfica muestra una relación inversamente proporcional entre la absorbancia y la concentración del aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii*, por lo tanto a mayor concentración (ppm) de AE, menor es la absorbancia obtenida.

Para presentar los porcentajes de disminución frente a la concentración del aceite, se obtuvo la ecuación logarítmica al tener una relación geométrica entre las variables, y se puede observar en la Figura 14.

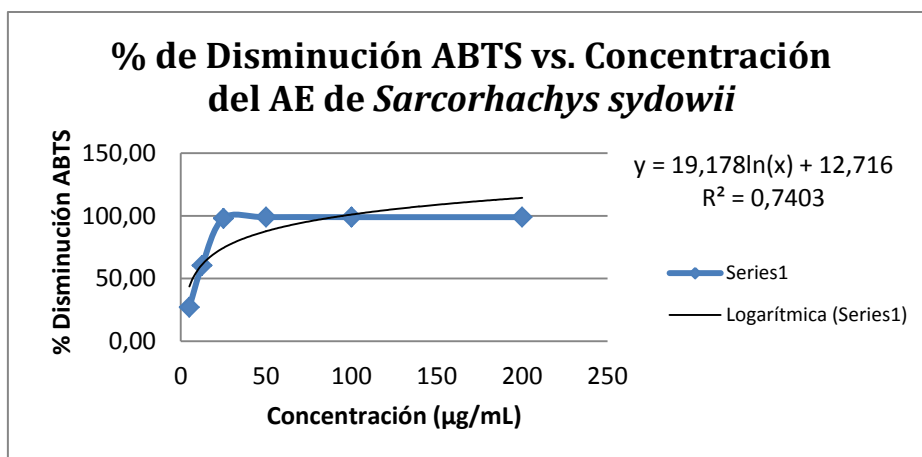


Figura 14. Porcentaje de Disminución de ABTS frente a las diferentes concentraciones de AE de *Sarcorhachis sydowii*

Fuente: Investigación directa

Elaboración: Rosales, Verónica

Con la ecuación obtenida en la gráfica se determina la actividad antioxidante, por el método ABTS, expresando los resultados como CI_{50} .

Así se obtuvo el siguiente resultado:

$$y = 19,178\ln(x) + 12,716$$

$$x = e^{\frac{50-12,716}{19,178}}$$

$$x = 6,96 \mu\text{g/mL}$$

El CI_{50} del aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii* que se obtuvo por el método ABTS es de 6,96 µg/mL; indicando una gran diferencia con el CI_{50} obtenido por el método DPPH que fue de 0,02 µg/mL.

La diferencia en los porcentajes de actividad antioxidante que se observan entre los dos métodos se debe a la longitud de onda que se emplearon para cada ensayo (Padilla et al. 2008).

4. CONCLUSIONES

- El aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii*, recolectado en el sector de Numbami-Zamora, muestra un rendimiento de 0,06% considerado bajo según bibliografía consultada.
- La humedad que se obtuvo fue de 76,41% valor que se encuentra dentro de los rangos de la humedad de las especies aromáticas.
- La densidad promedio obtenida de los aceites de las tres recolecciones fue de 0.906.
- El índice de refracción promedio obtenido de los aceites de las tres destilaciones de *Sarcorhachis sydowii* fue de 0,9066
- Se identificaron 61 compuestos que representan el 95,60% de los cuales 35 se identificaron en ambas columnas DB-5MS y HP-INNOWAX.
- Los compuestos identificados en su mayoría fueron del grupo de los sesquiterpenos hidrocarbonados (59%), seguidos de los monoterpenos hidrocarbonados (18,37%), sesquiterpenos oxigenados (10.98%), monoterpenos oxigenados (2,27%), entre otros compuestos que conformaron el 2,73%.
- El aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii* a diferentes concentraciones ensayadas no presentó actividad antibacteriana frente a las cepas bacterianas evaluadas. mientras que para las cepas fúngicas los aceites de la primera y segunda recolección mostraron una CMI de 500µg/mL y para los aceites de la tercera recolección mostró una CMI de 1000µg/mL.
- El aceite esencial de *Sarcorhachis sydowii* presentó un CI_{50} de 0,02µg/mL para DPPH y 6,96µg/mL para ABTS.

5. RECOMENDACIONES

- Controlar los parámetros del proceso de destilación, con el fin de obtener menor pérdida de los compuestos volátiles del aceite esencial.
- Realizar más estudios químicos que nos permitan evaluar la humedad en plantas de la misma especie, para poder comparar rendimientos.
- Realizar más estudios científicos que puedan validar las propiedades atribuidas a este género.
- Continuar con investigaciones sobre la actividad biológica de esta especie y otras plantas aromáticas, para determinar la CMI que presenten los aceites frente a bacterias y hongos con el fin de controlar las infecciones que puedan causar.
- Analizar otras formas de determinar la capacidad antioxidante de *Sarcorhachis sydownii* para poder tener estudios de comparación.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abad D., JC; Cabezas V., DP. 2014. Estudio de la Actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Piper pubinervulum* C. DC proveniente de Macas, Ecuador. Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales. Quito-Ecuador, Universidad Politécnica Salesiana.
- Adams, RP. 2009. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th. edition. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.
- Agilent Technologies, I. 2010. Guía de selección de columnas Agilent J&W para GC. EE.UU.
- Aguirre Mendoza, Z 2012. Dendrología del Sur del Ecuador. Loja Universidad Nacional de. Loja - Ecuador.
- Albado Plaus, E; Saez Flores, G; Grabiél Ataucusi, S. 2001. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). Revista Medica Herediana 12: 16-19.
- Almeida Velasco, GA; Suárez Cedillo, SE. 2014. Estudio de la Actividad antimicrobiana y antioxidante del Aceite esencial del Rizoma de *Renealmia thyrsoides* subsp. *thyrsoides* (Zingiberaceae). Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales, Universidad Politécnica Salesiana. Sede Quito.
- Arcila Lozano, CC; Loarca Piña, G; Lecona Uribe, S; González de Mejía, E 2004 "El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes." Trabajos de Investigación 54.
- Arias, T; Posada, RC; Bornstein, A. 2006. New Combinations in *Manekia*, an Earlier Name for *Sarcorrhachis* (Piperaceae). *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature* 16(2): 205-208.
- Asca, A; Aldea, K; Arrué, K; Valverde, K 2010. "Biología Médica." <http://biologiamedica.blogspot.com/2010/09/bacterias-gram-positivas-y-gram.html>.
- Cadby, PA; Troy, MGH. 2002. Consumer exposure to fragrance ingredients: Providing estimates for safety evaluation. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 36:246-252.
- Can Baser, KH; Demirci, B; Tabanca, N; Özek, T; Gören, N. 2001. Composition of the essential oils of *Tanacetum armenum* (DC.) Schultz Bip., *T. balsamita* L., *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: 195-200.
- Carhuapoma Y., M; Bonilla R., P; Suarez C., S; Villa, R; López G., S. 2014. Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de *Luma chequen* (Moliná) A. Gray "arrayán". (2014)
- Castañeda, MI; Muñoz, A; Martínez, JR; Stanschenko, EE. 2007. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. (2007)

- Celis, A; Mendoza, C; Pachón, M; Cardona, J; Delgado, W; Cuca, LE. 2008. Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia *Piperaceae*. *Agronomía Colombiana* 26: 97-106.
- De Castro, O; Senatore, F; Rigano, D; Formisano, C; Cennamo, P; Gianguzzi, L. 2007. Composition of the essential oil of *Petagnaea gussonei* (Sprengel) Rauschert, a relict species from Sicily (Southern Italy). *Flavour and Fragrance Journal*.
- Demirci, B; Can Baser, KH; Yildiz, B; Bahçecioglu, Z. 2003. Composition of the essential oils of six endemic *Salvia* spp. from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal* 18: 116-121.
- Dunkle, JW; Epidemiology, TUoTSoPH; Control, D. 2009. Characterization of *Staphylococcus Aureus* Isolates Associated with Pediatric Carriage in Houston, Texas, The University of Texas School of Public Health.
- Fernández, R; Segundo, C; Arenas, R; Diamante da, S; Guzmán, A. 2002. Determinación de las variedades de *Trichophyton mentagrophytes* en 10 casos de dermatofitosis de Paraguay. *Bioquímica* 27: 41-45.
- Fonnegra G., R; Jiménez R., SI. 2007. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. 2ª, Editorial Universidad de Antioquia.
- Frizzo, CD; Atti-Serafini, L; Echeverrigaray Laguna, S; Cassel, E; Lorenzo, D; Dellacassa, E. 2008. *Flavour and Fragrance Journal* 23: 99-106.
- Gallardo Montenegro, SN. 2011. Evaluación de tres tipos de sustratos en la multiplicación de plantas endémicas con fines medicinales y el procesamiento en sobres para infusión del sector de Buga bajo comunidad de Paquiestancia de la Parroquia de Ayora. Cayambe - Ecuador 2010. Ingeniería Agropecuaria. Cayambe, Universidad Politécnica Salesiana.
- García Rodríguez, JA; Cantón, R; García Sánchez, JE; Gómez-Lus, ML; Rodríguez- Avial, C; Vila, J. 2000. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Procedimientos en Microbiología Clínica* 11.
- González Villa, ÁA. 2004. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas, Universidad Nacional de Colombia. Sede Manizales.
- Granados Conde, C; Yáñez Rueda, X; Santafé Patiño, GG. 2012. Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas* 10: 12-23.
- Gross-Martínez, NT; Ureña-Sánchez, M; Chaves-Madrigal, O. 2014. Sensibilidad al fluconazol de aislamientos de *Trichophyton rubrum*. *Acta Médica Costarricense* 56: 23-26.
- Hernández-Salazar, A; Carbajal-Pruneda, P; Fernández-Martínez, R; Arenas, R. 2007. Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. Experiencia de 10 años (1996-2005) en un servicio de dermatología de un hospital general de la Ciudad de México. *Revista Iberoamericana de Micología* 24: 122-124.

- Jorgensen, PM; León-Yáñez 1999. Catalogue of the vascular plants of Ecuador. Botanical Garden Missouri. St. Louis, USA.: 1182.
- Lanza, JG; Moreno, S; Ortiz, S; Fuentes, JC. 2010. Caracterización por cromatografía de gases y evaluación de la actividad citotóxica del aceite esencial de *Salvia occidentalis* Sw. (Lamiaceae) proveniente del estado Monagas, Venezuela. Avances en Química 5(3): 147-151.
- Linares Palomino, PJ 2008. Prácticas de Química de los Aceites esenciales. Jaén Universidad de.
- Lizcano, A; Vergara, J. 2008. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o Aceites Esenciales de las especies vegetales, Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatógeno. Trabajo de grado (Microbiología Industrial): Bogotá DC: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Carrera de Microbiología Industrial. Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides, y Passiflora Mannicata frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos, Trabajo de Grado, Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana.
- López, SN; Lopes, AA; Batista Jr, JM; Flausino Jr, O; Bolzani, VdS; Kato, MJ; Furlan, M. 2010. Geranylation of benzoic acid derivatives by enzymatic extracts from Piper crassinervium (Piperaceae). Bioresource Technology 101(12): 4251-4260.
- Martínez, EM; Ocampo, CB. 1988. Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados, Universidad Nacional Autónoma de México. 9-10.
- Mesa, AM; Rincón, DC; Toro, JF; Tamayo, A; Blair, S; Rojano, B. 2011. Actividad Antioxidante de *Piper Piedecuestanum* Trel. & Yunck. y *Piper Subpedale* Trel. & Yunck.
- Mire, BJ. 1962. Los aromaticos en la industria moderna: aplicacion industrial de las esencias naturales y sinteticas. Sintesis. 2, Sintesis.
- Molares, S; S.González; Ladio, A; Castro, M. 2009. Etnobotánica, anatomía y caracterización físico-química del aceite esencial de *Baccharis obovata* Hook. Et. Am. (Asteraceae: Asteraceae). Acta Botânica Brasilica 23: 578-589.
- Muñoz Acevedo, A; Castañeda, MI; Blanco, KM; Cardenas, CY; Reyes, JA; Kouznetsov, V; Stashenko, EE. 2007. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. 2007 1(33).
- Murillo, MCÁ; Suarez, LEC; Salamanca, JAC. 2014. Actividad insecticida sobre Spodoptera frugiperda (Lepidóptera: Noctuidae) de los compuestos aislados de la parte aérea de Piper septuplinervium (Miq.) c. dc. y las inflorescencias de Piper subtomentosum Trel. & Yunck. (Piperaceae). Química Nova 37: 442-446.
- NIST Mass spectral library. Data center. Stein. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA.
- Ochoa Pumaylle, K; Paredes Quiroz, LR; Bejarano Luján, DL; Silva Paz, RJ. 2012. Extraction, characterization and evaluation of antibacterial activity of essential oil of *Senecio graveolens* Wedd (Wiskataya). Scientia Agropecuaria 3: 291-302.

- Olgún Pérez, LPB; Rodríguez Magadán, HMB 2004. Métodos en Biotecnología. Instituto de Biotecnología.
- Oliva, MdlMM 2011. Actividad Biológica de los aceites esenciales: su aplicación como Fitofármaco. Congreso de la Facultad de Medicina UNAM. México.
- Padilla, F; Rincón, A; Bou-Rached, L. 2008. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. Archivos Latinoamericanos de nutrición: 14-15.
- Páez Perilla, ÁV 2013. Aceites esenciales: extracción, usos y aplicaciones. Métodos de extracción, análisis y control de calidad. SENA.
- Patzelt, E. 1996. Flora del Ecuador. 2ª, Banco Central del Ecuador. 16.
- Pino, O; Sánchez, Y; Rojas, MM; Rodríguez, H; Abreu, Y; Duarte, Y; Martínez, B; Peteira, B; Correa, TM; Martínez, D. 2011. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD PLAGUICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE Melaleuca quinquenervia (Cav) S.T. Blake. Revista de Protección Vegetal 26: 177-186.
- Pontón, J; Moragues, MD; Gené, J; Guarro, J; Quindós, G. 2002. Hongos y actinomicetos alergénicos. Revista Iberoamericana de Micología.
- Prats, G. 2006. Microbiología Clínica, Editorial Médica Panamericana. 17.
- Rodríguez Álvarez, M; Alcaráz Meléndez, L; Real Cosío, S 2012. Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. Edit.Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste S.C. La Paz, Baja California Sur, México.
- Rodríguez Angeles, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública México 44: 464-475.
- Rodríguez, G. 2008. Géneros Streptococcus y Enterococcus. Temas de Bacteriología y Virología Médica: 273-290.
- Salazar Mora, AP; Mayanquer Chuga, SI. 2009. Obtención de aceites esenciales de cedrón (*aloesia triphylla*), sunfo (*clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze) y hierbaluisa (*cymbopogon citratus*), en un alambique tipo cachimbo por cohobación. Título de Ingeniero Agroindustrial. Ibarra-Ecuador, Universidad Técnica del Norte.
- Sánchez, Y; Pino, O; Correa, TM; Naranjo, E; Iglesia, A. 2009. ESTUDIO QUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DEL ACEITE ESENCIAL DE Piper auritum KUNTH (CAISIMÓN DE ANÍS). Revista de Protección Vegetal 24: 39-46.
- Soto, A; Moreira, MD; Pallini, A. 2011. Análisis de la composición química de la cutícula de *Tetranychus Evansi* Backer & Pritchard y de *Tetranychus Urticae* Koch (Acari:Tetranychidae). Centro de Museos. Museo de Historia Natural 15(2): 171-190.
- Tortora, GJ; Funke, BR; Case, CL. 2007. Introducción a la microbiología, Editorial Médica Panamericana Sa de. 86.
- Tovar del Rio, J. 2013. Determinación de la Actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la Ecorregión cafetera. Químico Industrial. Pereira, Universidad Tecnológica de Pereira.

- Valarezo Valdez, BE; Meneses Chamba, MÁ 2014. Evaluación de la flora aromática de la Provincia de Zamora Chinchipe. Poyecto de Investigación. PROY QUI-861. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Wanke, S; Jaramillo, MA; Borsch, T; Samain, M-S; Quandt, D; Neinhuis, C. 2007. Evolution of Piperales—matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42(2): 477-497.
- Wiat, C. 2006. *Medicinal Plants of Asia and the Pacific*. CRC Press 2006. Ilustrada, Taylor & Francis. 336.

ANEXOS

ANEXO I

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:

- Estufa
- Pinza
- Balanza
- Crisol
- Desecador

PROCEDIMIENTO:

- Pesar en una cápsula o luna de reloj de 2 a 10 gramos de la muestra, seguidamente colocarla durante dos horas en una estufa a 105°C ($\pm 5^\circ\text{C}$).
- Enfriar la cápsula en el desecador por 10 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 una hora, enfriar en el desecador y pesar.
- Repetir el procedimiento hasta que el peso de la cápsula sea constante. Dicho peso se toma como en gramos como el peso de la cápsula más la muestra seca.

CÁLCULO:

$$Hm = \frac{(m1 - m2)}{(m1 - m)} * 100$$

Donde:

Hm: % de humedad

m: peso de la cápsula vacía (g)

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

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

ANEXO II

DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO

Para calcular el porcentaje del 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:

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

Donde:

R: Rendimiento expresado en porcentaje

V: Volumen del aceite esencial extraído en mL

P: Peso de la materia vegetal empleada en la destilación

ANEXO III

Según la ANFOR NF T 75-111 JUNIO 1982

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

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, manteniendo a una temperatura de 20°C ± 0,2°C.

- Termómetro de precisión graduado de 10 a 30°C, con una variación de 0,2°C a 0,1°C.
- Balanza analítica.

PROCEDIMIENTO:

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

EXPRESIÓN DE RESULTADOS:

La densidad relativa d_{20}^{20} se la expresa con la siguiente formula:

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

Donde:

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

m_0 : masa en gramos del picnómetro vacío.

m_1 : masa en gramos del picnómetro con agua.

m_2 : masa en gramos del picnómetro con el aceite esencial.

Se expresan los resultados con tres decimales.

ANEXO IV

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 $(589,3 \pm 0,3)\text{nm}$, correspondiente a la radiación D1 y D2 del espectro de sodio.

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

APARATOS:

Refractómetro: Utilice un refractómetro clásico que permita la lectura de los índices de refracción entre $1,300$ y $1,700$ o con una precisión de $\pm 0,0002$.

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

1.3330 para agua destilada

1.4906 para el p-cimeno

1.5685 para el benzoato de bencilo

1.6585 para el 1-bromo naftaleno.

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

MODO DE OPERACIÓN:

Determinación

Pasar una corriente de agua en el refractómetro, a fin de mantener el aparato a la temperatura de referencia de 20°C salvo para los aceites esenciales que no son líquidos a esa temperatura. En este caso deben adoptarse las temperaturas de 20°C y 30°C., según el punto de fusión del aceite esencial considerado. Esta temperatura no debe diferir de la temperatura de referencia más de $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ y debe mantenerse a $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

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

RESULTADOS:

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

$$n_D^t - n_D^{20} + 0.0004 (t' - t)$$

Donde:

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

F: factor de corrección (0.0004)

t': temperatura a la que se efectuó la lectura

t: temperatura a 20°C.

Nota:

Expresar los resultados con cuatro cifras decimales.

La precisión de la determinación es de ± 0.0002